

Année 1964 - N° 513

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE QUELQUES AGENTS
METHEMOGLOBINISANTS ET DE LEURS PROPRIÉTÉS
HÉPATO-TOXIQUES EVENTUELLES**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon

Section de Pharmacie

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté Mixte
de Médecine et de Pharmacie de LYON

le 22 Décembre 1964

par

Daniel BROQUET

Interne en Pharmacie des Hôpitaux de Grenoble

Né le 1^{er} Mars 1937

à BOURG-EN-BRESSE (Ain)

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens Honoraires :

M. J. LEPINE - Membre de l'Institut

M. H. HERMANN - Correspondant de l'Institut

Doyen :

M. J. F. CIER

Assesseurs : MM. M. LEVRAT
L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL
GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET,
HERMANN, ROCHET, POLLOSSON.

PROFESSEURS

MM. CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS(détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-psychiatrique et d'Hygiène mentale
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale P
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique Obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie.

MM. COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-phtisiologie
CREYSSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique
DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Clinique médicale D
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique médicale Infantile et Hygiène du 1er Age
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique de stomatologique
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
DUMONT Louis	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J. F.	Physiologie A
PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
MICHAUD Pierre	Clinique de Chirurgie cardiaque
X.....	Clinique des maladies infectieuses
X.....	Biologie médicale et pharmacodynamie
X.....	Clinique gynécologique
X.....	Thérapeutique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM. BERGER MM	Physique nucléaire appliquée à la médecine
BERTOYE	Bactériologie
MANSUY	Neuro-chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
SARROUY	Clinique de pédiatrie et puériculture
LACROIX	Hygiène et climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
CIER André	Pharmacie Chimique et Pharmacologie
PONT Maurice	Médecine générale



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554209_0009

MM. ROMAN.
FEROLDI
MORET
ODDOUX.
de SOLLIERS
DESPIERRES
TOLOT
GARIN

Parasitologie
Anatomie pathologique
Physique biologique
Botanique et cryptogamie
Chimie analytique
Médecine générale
Médecine du travail
Parasitologie

MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES TITULAIRES

MM. CREYSSSEL Roger
THIVOLET
PINET
GUYOTAT
DESCOTES
JUVET
PEYRIN
TOMMASI
BUFFARD
LEJEUNE
de MOURGUES F.
NAUSSAC
REBOUILLAT
ROMAGNY
DELAHAYE
DELEUZE
GIRAUD
MICHEL
FRANCOIS
MICHOUPLIER
COLOMB
LAMBERT
FRIES
GILLY
ROBERT
BOUCHET
BETHENOD
GERMAIN
LARBRE
SOUSTELLE
VIALA
VINCENT
KALB

Chimie biologique
Hygiène
Electro-Radiologie
Neuro-psychiatrie
Chirurgie générale
Pathologie expérimentale
Physique biologique
Anatomie pathologique
Electro-radiologie
Médecine générale et thérapeutique
Stomatologie
Maladies infectieuses
Chirurgie générale
Pédiatrie
Médecine générale
Anesthésiologie
Electro-radiologie diagnostic et thérapeutique
Anesthésiologie
Pédiatrie et puériculture
Chirurgie générale
Dermatologie
Médecine générale
Médecine générale
Pédiatrie
Médecine générale
Anatomie
Pédiatrie
Immunologie, sérologie, hématologie
Pédiatrie
Chirurgie générale
Médecine générale
Bactériologie, parasitologie, virologie
Pneumo-phthisiologie

MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES STAGIAIRES

MM. FAVRE - GILLY
GIROD

Hématologie
Histologie et embryologie

MALLEIN
RIFFAT
FAUCON
FLANDROIS
VALLIER-RAYNARD
ROLLET

Chimie analytique
Hygiène
Biologie médicale et pharmacodynamie
Physiologie
Bactériologie
Pharmacie galénique

AGREGES EN EXERCICE

MM. BONNAMOUR
COLIN
de MOURGUES Georges
DEVIC
DUMONT Martial
DURAND
FRANCILLON
SAUBIER
SCHOTT
ALLEGRE
CHASSARD
FAYSSE
GAILLARD
GARDE
HUGONNIER

MARET
MORNEX
NORMAND
PERRIN André
DUMAS
GARMIER
NOEL
SCHNEPP

Ophtalmologie
Médecine légale
Chirurgie générale
Médecine générale
Obstétrique
Urologie
Chirurgie générale
Chirurgie générale
Neuro-psychiatrie
Neuro-chirurgie
Electro-radiologie
Orthopédie
Oto-rhino-laryngologie
Médecine générale
Ophtalmologie

Chirurgie générale
Médecine générale
Médecine générale
Médecine générale
Stomatologie
Obstétrique
Médecine générale
Orthopédie

Examineurs de la Thèse :

Président : M. Le Professeur CIER, A

Assesseurs : MM. DREVON, B
MALLEIN R.
BOUCHERLE, A.

A MA FEMME,

avec tout mon amour,

A MES PARENTS,

En témoignage de toute mon affection
et de toute ma gratitude.

A MES BEAUX - PARENTS

En affectueux Hommage.

A MA FAMILLE,

A MA BELLE-FAMILLE,

A TOUS MES AMIS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur A. CIER.

Après nous avoir accueillis dans son laboratoire, il a bien voulu nous confier le sujet de cette thèse. Puis il a guidé tous nos travaux de ses conseils presque journaliers. Aujourd'hui, il accepte de présider notre Jury Son dévouement et sa compétence nous ont profondément touchés.

Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de notre très grande reconnaissance et de notre respectueux attachement.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur B. DREVON

Il nous a fait le très grand honneur d'accepter de faire partie de notre Jury.

Nous le prions de bien vouloir trouver ici l'assurance de notre sincère gratitude.

Monsieur le Professeur Agrégé

R. MALLEIN

Nous sommes sensibles à l'honneur qu'il nous a fait de bien vouloir être notre Juge. Nous l'en remercions très respectueusement.

Monsieur le Professeur A. BOUCHERLE

Pendant nos études, où nous avons pu apprécier la qualité de son enseignement, et pour terminer nos travaux, il nous a accueillis avec bienveillance dans son laboratoire.

Aujourd'hui, il a accepté de se déplacer à Lyon pour juger notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de nos remerciements les plus sincères et de notre respectueuse reconnaissance.

A TOUS NOS MAITRES DE LA FACULTE
MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMA-
CIE DE GRENOBLE.,

dont nous avons, tout
au long de nos études, apprécié l'ensei-
gnement.

A Monsieur Le Professeur G. CARRAZ,

qui nous a ouvert, les
portes de son laboratoire pour terminer
notre expérimentation.

A Monsieur le Professeur A. COEUR,

A Monsieur A. ROUX,

Pharmacien-Chef de l'Hôpital de
Grenoble, notre Chef de Service Hospi-
talier, qui nous a toujours facilité la tâ-
che au cours de notre internat ; nous
l'en remercions très vivement.

A nos camarades de l'internat en
Pharmacie des Hopitaux de Grenoble.

A nos camarades de laboratoire aussi
bien Grenoblois que Lyonnais qui nous
ont toujours aidés au cours de notre
expérimentation.

P L A N

- INTRODUCTION

I - PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I - 1 - Les agents méthémoglobinisants

I - 1 - 1 - Activité méthémoglobinisante et structure chimique

I - 1 - 2 - Mécanismes d'action des agents méthémoglobinisants

I - 2 - Action méthémoglobinisante et atteinte hépatique.

II - DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES PERSONNELLES

II - 1 - Protocole expérimental

II - 2 - Techniques analytiques

II - 2 - 1 - Dosage de la méthémoglobine et de l'hémoglobine totale : technique d'Evelyn et Malloy

II - 2 - 2 - Dosage de la transaminase glutamique oxalacétique sérique (S.G.O.T.)

II - 2 - 3 - Dosage des phosphatases alcalines sériques.

II - 2 - 4 - Dosage de la lactico - deshydrogénase sérique (L.D.H.)

II - 2 - 5 - Dosage de l'aldolase sérique.

II - 2 - 6 - Les mesures de la densité optique

II - 3 - Résultats

- Activités methémoglobinisantes comparées :

- en fonction de la durée de l'intoxication (tableau III, figures 3 et 4).
- en fonction de la dose administrée (tableau IV, figure 5).
- dans des conditions de temps et de dose identiques (tableaux V et VI, figure 6).

- Activité hépato-toxique :

- en fonction de la durée de l'intoxication (tableau VII, figure 7).
- en fonction de la dose administrée. (tableau IX, figure 9).
- dans des conditions de temps et de dose identiques (tableaux X et XI, figure 10).

II - 4 - Discussion et interprétation des résultats

II - 4 - 1 - Validité des protocoles expérimentaux

II - 4 - 2 - Activité methemoglobinisante ou hépato-toxique et structure chimique.

- CONCLUSIONS

- BIBLIOGRAPHIE

I N T R O D U C T I O N

L'activité méthémoglobinisante de nombreux agents thérapeutiques est bien connue : dès 1897 SZIGHETTI (91) mettait en évidence le pouvoir méthémoglobinisant de l'aniline et des anilides administrés même à faible dose chez l'animal. Ces recherches ont eu un regain d'intérêt au début de ce siècle, en raison du nombre d'intoxications provoquées par l'aniline (58, 59, 65), et les colorants d'aniline (58, 89).

Sans doute les anémies hémolytiques, les granulocytopénies et les agranulocytoses aiguës d'origine médicamenteuse sont-elles, à l'heure actuelle, les effets secondaires sanguins les plus graves parmi ceux que sont susceptibles d'induire certaines des thérapeutiques modernes. Il n'en reste pas moins que les méthémoglobinémies provoquées par divers agents, thérapeutiques ou non, présentent un intérêt à la fois pratique et théorique.

Le taux "normal" de méthémoglobine ne dépasse pas chez l'homme et la plupart des espèces animales un pour cent, et l'on peut atteindre des méthémoglobinémies de 40 % sans observer pour autant des effets létaux. Selon RABBENO et collaborateurs (74) ceux-ci correspondraient à des méthémoglobinémies de 80 %, chez le lapin.

Il y a dans cette tolérance à une méthémoglobinisation un problème d'espèce. Nous y reviendrons plus loin, mais bien que l'homme soit particulièrement sensible, il faut noter que plusieurs agents méthémoglobinisants ont été utilisés en thérapeutique, dans les intoxications cyanées notamment et comme radioprotecteurs (22, 23, 38, 90).

Détoxiqués généralement dans le foie, les composés méthémoglobinisants présentent pour certains une hépatotoxicité ; c'est le cas, en particulier, de l'aniline et des composés voisins (8).

Ces deux phénomènes sont-ils liés ? La plupart des auteurs qui ont étudié les effets toxiques, des amines aromatiques et de leurs dérivés, se sont peu intéressés à cette question.

A notre connaissance, SCHEFF (81) est le seul qui ait tenté d'élucider ce problème en comparant les actions méthémoglobinisantes de l'aniline et du paraaminophénol sur des rats hépatectomisés ou non.

Les résultats obtenus, assez contradictoires, sont d'une interprétation difficile ; ils tendent toutefois à démontrer qu'il existe une relation directe entre les deux processus toxiques.

C'est ce qui nous a incités à reprendre cette étude et à comparer, de façon systématique, ce qui ne semble pas avoir été réalisé jusqu'ici, les actions méthémoglobinisantes et hépato-toxiques, des plus connus parmi les composés chimiques auxquels sont classiquement attribués ces effets secondaires.

P R E M I E R E P A R T I E

G E N E R A L I T E S

CHAPITRE I - 1 -

LES AGENTS METHEMOGLOBINISANTS.

Les méthémoglobinémies d'origine médicamenteuse ou toxique s'accompagnent en général de signes cliniques et biologiques, vraisemblablement secondaires à l'hypoxie cellulaire qui résulte du blocage sous sa forme oxydée du pigment sanguin.

Les symptômes cliniques classiques sont de la dyspnée et une cyanose intense de la peau et des muqueuses.

Sur le plan biochimique, il a été signalé une hyperglycémie, une cétonémie qui porte principalement sur l'acide β hydroxybutyrique (18) et une baisse des taux normaux de calcium, phosphore et magnésium du sérum (85). Ces variations suivent en importance, et dans le temps, les taux de méthémoglobine.

Les atteintes les plus importantes sont d'ordre hématologique : on observe parfois au début de certaines intoxications, notamment par l'aniline et les nitrates, une polyglobulie ; mais la règle est d'observer, à la suite d'une intoxication aiguë ou chronique par l'aniline, une anémie avec augmentation du nombre des réticulocytes (1) et apparition de "corps de Heinz" * (1, 32, 34, 60)

La recherche de ces corpuscules présente un intérêt diagnostique majeur : leur présence dans le sang persiste plusieurs jours après la disparition de la méthémoglobinémie (34). Par ailleurs, certains auteurs admettent que le degré d'anémie provoquée par les agents méthémoglobinisants est proportionnelle au nombre de corps de Heinz apparus au cours de l'intoxication.

I - I - 1 - ACTIVITE METHEMOGLOBINISANTE et STRUCTURE CHIMIQUE -

Il est classique de distinguer dans les agents méthémoglobinisants :

- les composés minéraux
- les dérivés organiques.

Nous suivrons également cette classification malgré la part d'arbitraire qu'elle comporte.

* Produits de décomposition des érythrocytes, les corps ou corpuscules de Heinz se forment in vivo ou in vitro sous l'action de certains agents, en particulier l'aniline et les sulfamides. Ils se colorent sur lame avec une solution de bleu de Nil, à 0,5 % dans l'alcool absolu.

Ils sont relativement nombreux, et nous ne prétendons pas ici en dresser une liste exhaustive. Il faut signaler tout d'abord les hydroxylamines (29, 35), les agents oxydants tels que le ferricyanure de potassium (66), les chlorates (48, 57, 62), les chlorites (62), et surtout le nitrite de sodium.

Ce dernier sel a fait l'objet d'un très grand nombre de travaux (3, 5, 40, 46, 47, 50, 61, 67, 74, 76), en raison de sa toxicité et de son emploi éventuel, bien qu'interdit, dans l'industrie alimentaire.

I - I - I - 2 - Les composés organiques -

Ce sont avant tout les dérivés aminés aromatiques (97). Les travaux les plus importants concernent l'aniline et ses dérivés (15, 35, 41, 73, 84, 92, 102, 103), les colorants d'aniline (58, 65), et les anilides (20, 53), utilisés en thérapeutique. Sont également considérés comme méthémoglobinisants, les aminophénols (39, 64, 69), les dérivés nitrés aromatiques tels que le nitrobenzène (36, 41, 75), et la paraaminopropiophénone (63).

L'action méthémoglobinisante de l'aniline et de ses dérivés a été reliée à la formation dans l'organisme de métabolites, et notamment de phenylhydroxylamine (1, 29).

Il est possible que les composés nitrés puissent conduire par réduction à des dérivés aromatiques de l'hydroxylamine. Toutefois, cette voie métabolique n'est pas la seule qui puisse être envisagée.

Il faut noter aussi que les composés formés ne sont pas qualitativement et quantitativement identiques, lorsqu'on passe d'une espèce animale à l'autre, ce qui rend compte peut-être de leur sensibilité très différente aux agents méthémoglobinisants.

Les recherches effectuées sur des anilides ont montré que le pouvoir méthémoglobinisant était lié aux possibilités de désacylation de la molécule dans l'organisme (7). Des anilides éliminés intransformés dans l'urine se sont avérés, en effet, dépourvus d'activité méthémoglobinisante (20).

Non méthémoglobinisant par lui-même, l'ion nitrate peut, dans certaines conditions, être réduit dans l'organisme, en nitrite, et sous cette forme être responsable de méthémoglobinémies éventuellement toxiques (52, 85, 99).

Chez l'homme (21, 79), des recherches récentes ont démontré que cette voie métabolique n'existait pas normalement chez l'adulte. Ces derniers travaux démontrent l'importance des métabolites éventuels d'une substance considérée dans les processus de méthémoglobiniisation.

Nous venons d'envisager les groupes chimiques les plus importants, dans lesquels se trouvent des agents méthémoglobinisants. Il semble difficile de les classer de façon cohérente. Dans un travail récent, AKAHORI (1) a cependant tenté de le faire, en se basant sur la vitesse de formation de la méthéoglobine chez le lapin.

Le tableau ci-dessous rend compte de cette tentative :

Produits minéraux	Dérivés organiques		
	Métabolites supposés de l'aniline	Dérivés hydroxy	Dérivés nitrés
Permanganate de potassium	Phenylhydroxylamine	Paraquinone	Trinitrophénol
Ferricyanure de potassium	Orthoaminophénol	Pyrogallol	2-4 dinitrophénol
	Paraaminophénol	Naphtoquinone	Orthonitrophénol
Nitrite de sodium	2 amino 4 nitrophénol	Phénol	Paranitrophénol Nitrobenzène
Hydroxylamine		Résorcinol	
		Benzaldé- hyde	
Bichromate de potassium			Métanitrophénol
Chlorure cuivreux			Ortho et para nitrotoluène = 0

Tableau I - Classification des agents méthémoglobinisants selon AKAHORI (1)

Nous avons nous-mêmes, à l'issue de notre travail, rangé les différents composés expérimentés dans l'ordre décroissant des méthémoglobinémies qu'ils provoquent. Il n'a pas été possible jusqu'ici de proposer une classification physiologique valable des composés doués d'une activité méthémoglobinisante.

I - I - 2 - Les MECANISMES d'ACTION des AGENTS METHEMOGLOBINISANTS-

On sait que la méthémoglobine représente une forme oxydée de l'hémoglobine dans laquelle le fer, lié aux azotes pyrazoliques, se trouve à la valence 3. Sans entrer dans les problèmes de structure, les schémas ci-dessous rendent compte des relations existant entre l'hémoglobine réduite, l'oxyhémoglobine, la méthémoglobine, et les pigments apparentés :

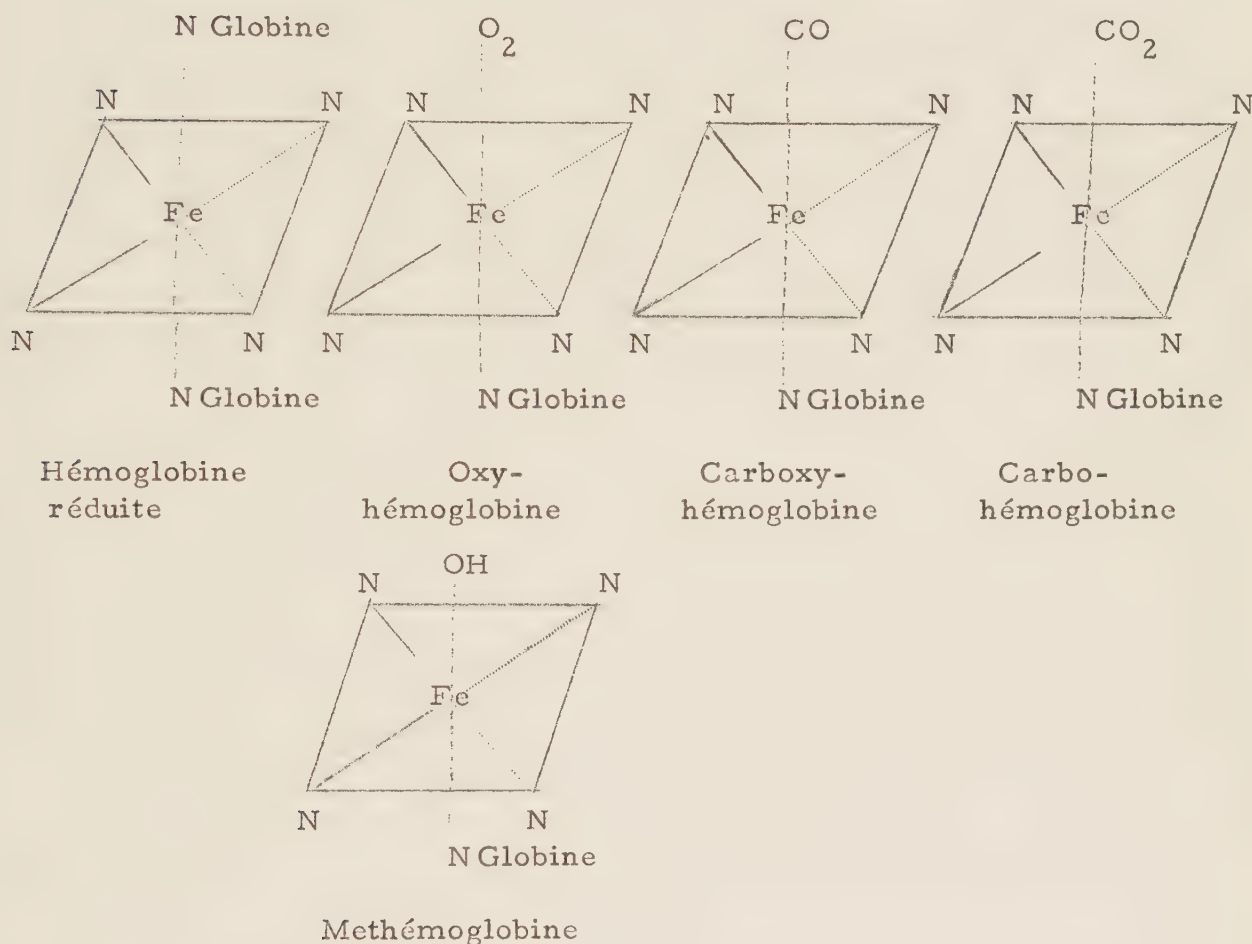


Figure I : Schémas de la constitution de l'hémoglobine et des pigments apparentés.

Ainsi l'équilibre entre hémoglobine et méthémoglobine correspond à la réaction suivante :



On conçoit dès lors, qu'une méthémoglobinisation doit correspondre à une réaction d'oxydation.

Celle-ci peut intéresser aussi bien l'hémoglobine réduite que l'oxyhémoglobine, la carboxyhémoglobine ou la carbohémoglobine, ainsi qu'il est montré dans le schéma suivant emprunté à POLONOWSKI (72)

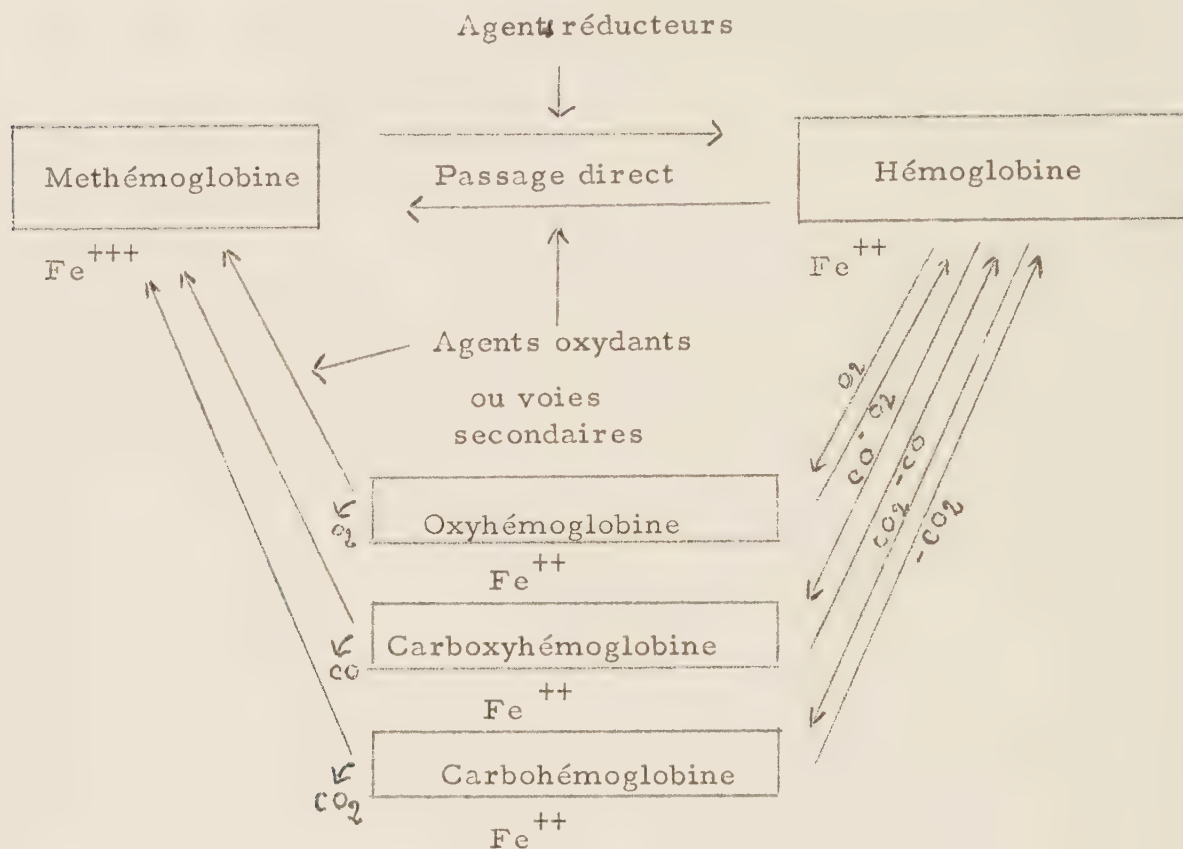


Figure II - Schéma de la formation de méthémoglobine selon POLONOWSKI (72).

Un tel mécanisme rend compte valablement, semble-t-il, des effets méthémoglobinisants des agents oxydants.

Il faut cependant observer que tous les réactifs doués de propriétés oxydantes ne sont pas pour autant responsables de la formation de méthémoglobine.

Il paraît surtout difficile de faire intervenir dans un tel mécanisme les composés organiques doués de propriétés réductrices, dont nous avons signalé plus haut l'activité méthémoglobinisante ; qu'il s'agisse d'aniline ou du métabolite supposé actif la phenylhydroxylamine, qu'il s'agisse du nitrite de sodium ou d'un composé nitré aromatique, le mécanisme de leur action méthémoglobinisante est encore l'objet de recherches in vivo et in vitro (28, 29, 37, 43, 49, 55, 96), et aucune théorie valable ne semble avoir été émise jusqu'ici.

On admet cependant qu'il faut rapporter la formation de méthémoglobine à une réaction chimique définie : étudiant l'activité méthémoglobinisante du système hydroquinone-quinone, AKAHORI (1) et NAKAJIMA (63) ont démontré qu'il existait un rapport stéchiométrique entre le taux de méthémoglobine et la concentration en hydroquinone. Dans les conditions expérimentales adoptées, une molécule d'hydroquinone donne lieu à la formation de quatre molécules de méthémoglobine.

Malgré tout l'intérêt qui s'y attache, nous ne pouvons discuter ici ce problème.

Nous voudrions simplement souligner ou rappeler que l'oxydation de l'hème en hématine, c'est-à-dire le passage du fer ferreux en fer ferrique, est pratiquement immédiat dans une solution aqueuse aérée ; au contraire, couplé avec la globine, l'hème présente sous la forme d'hémoglobine une stabilité remarquable et seulement la possibilité de fixer l'oxygène moléculaire par une valence de coordination.

L'oxyhémoglobine est susceptible de se changer en méthémoglobine in vitro, mais cette auto-oxydation est infiniment plus lente et correspond à une cinétique de réaction affectée d'un facteur de 10^{-8} par rapport à l'oxydation de l'hème en hématine. (96) *

* On peut dès lors envisager que le composé organique non oxydant doué de propriétés méthémoglobinisantes se fixe, transitoirement ou non, sur la partie protéique du pigment pour permettre une auto-oxydation du groupement prosthétique, avec passage du fer ferreux en fer ferrique.

CHAPITRE I - 2 -

ACTION METHEMOGLOBINISANTE et ATTEINTE HEPATIQUE

C'est BROWN (8) qui dès 1917 a montré qu'à côté de son action méthémoglobinisante l'aniline était douée d'autres effets secondaires toxiques, notamment au niveau de l'hépatocyte où l'on trouve après administration d'aniline à doses sub-létales des foyers de nécrose.

Mise en évidence par l'histologie, cette atteinte a été confirmée par différents tests biochimiques, notamment l'augmentation de la catalase (32) et de la prothrombine sérique (94), à la suite d'une intoxication à l'aniline.

A notre connaissance cependant, un seul auteur a tenté de relier les deux processus toxiques - méthémoglobinémie et atteinte hépatique - : opérant sur des rats, SCHEFF (81) a démontré que l'action méthémoglobinisante était pratiquement inhibée ou fortement réduite après hépatectomie totale dans le cas où l'agent expérimenté est l'aniline ; dans ces mêmes conditions expérimentales, le paraaminophénol s'est avéré au contraire nettement plus méthémoglobinisant.

Ces résultats apparemment paradoxaux sont d'une interprétation délicate : on peut envisager l'intervention du foie dans la formation de méthémoglobine (cas de l'aniline), et dans sa reconversion en hémoglobine (cas du p-aminophénol.).

Quels que soient les mécanismes mis en jeu, ces essais démontrent qu'il peut y avoir une relation entre activité méthémoglobinisante et hépatotoxicité.

Le parenchyme hépatique occupe une position clé dans les processus métaboliques de dégradation et de synthèse. Le nombre des réactions qui s'y déroulent rend compte de la multiplicité des tests préconisés pour permettre l'exploration fonctionnelle du foie. Ils ont été au début, pour la plupart, les résultats d'essais empiriques, mais la conjonction des recherches morphologiques et biochimiques a permis d'envisager, ces dernières années, une interprétation cohérente des voies du métabolisme hépatique et des corrélations existant entre la clinique, la pathologie et la chimie pathologique.

L'introduction de tests enzymatiques notamment, a apporté une quantité de connaissances nouvelles concernant l'étiologie et l'évolution des atteintes hépatiques de toutes origines. A la fois très sensibles et pour certains doués d'une hépato-spécificité remarquable, ils tendent à supplanter les batteries de tests classiques, même pour les contrôles courants en biologie clinique.

On sait en effet que les taux plasmatiques de diverses enzymes sont normalement très bas, de mille à un million de fois plus faibles que dans les organes ou les tissus. Il existe donc une très légère diffusion, physiologique des enzymes tissulaires vers le milieu extra-cellulaire. Mais à toute atteinte cellulaire correspondra une hyperenzymémie brutale dont l'importance et la durée chiffreront le degré de la lésion organique. Tout comme la morphologie de chaque organe est hautement spécifique, leur équipement biologique est suffisamment différencié pour permettre, dans une certaine mesure, de les reconnaître.

Selon RICHTERICH (78), les hyperenzymémies consécutives à une lésion hépatique peuvent être la conséquence de plusieurs mécanismes successifs :

- Altérations de la membrane de l'hépatocyte :

Les enzymes témoins d'une diffusion exagérée du contenu cytoplasmique dans le sang circulant sont notamment :

- les transaminases - transaminases glutamiques oxalacétiques
S.G.O.T. * transaminases glutamiques pyruviques,
S.G.P.T. **
(2, 6, 13, 14, 19, 27, 31, 44, 45, 51, 54, 68, 70, 80, 82, 83, 95, 101).
- la 1 phospho-fructo-aldolase (2, 6, 10, 11, 12, 13, 17, 70, 80, 83, 87, 95, 104).
- la lactico-deshydrogenase (31, 44, 70, 80, 82, 86, 93, 95).

*

S.G.O.T. est le sigle adopté par la plupart des publications anglo-saxonnes, T.G.O.S. étant parfois utilisé par les auteurs français. Nos résultats sont exprimés en unités de transaminases / Ez, G.O.T. Color.

**

Chez l'homme, les taux élevés de transaminases glutamiques pyruviques sont considérés comme plus spécifiques qu'une augmentation de la transaminase glutamique oxalacétique, pour juger d'un dysfonctionnement hépatique. Il semble que ce soit le contraire chez le rongeur, notamment la souris et le rat ; les variations de S.G.O.T. sont, en général, plus importantes que celles de S.G.P.T. au cours des hépatites toxiques ou nutritionnelles.

Depuis plusieurs années, les variations de transaminases S.G.O.T. sont les seules qui aient été retenues au laboratoire de Pharmacologie, pour suivre l'évolution d'une atteinte hépatique toxique aiguë.

- Processus dégénératifs et nécrobiotiques :

Lorsque la lésion cellulaire devient importante, les lysosomes déchargent, à leur tour, leurs enzymes dans le cytoplasme, puis le plasma. L'élévation des taux plasmatiques de sulfatase et de β glycuronidase, devrait être expliquée par cette origine. Ce type de disenzymémie est encore peu connu et nous n'avons pas étudié les variations de leurs taux sériques, au cours de notre étude expérimentale.

- Lyse des mitochondries de l'hépatocyte :

La présence dans le plasma de grandes quantités de glutamodeshydrases et d'alcool-deshydrases rend compte de ce stade lésionnel. Leur dosage permet de mieux saisir le degré de l'atteinte hépatique, au cours notamment d'une intoxication chronique.

- Stase biliaire au cours des états d'obstruction intra ou extra hépatique :

Les stades précoces de l'obstruction des canaux biliaires, ne se signalent souvent que par une hausse de concentration de certaines enzymes plasmatiques, en particulier, des phosphatases alcalines (6, 25, 70, 71). Une hyperenzymémie de ce type est déjà caractéristique d'une atteinte biliaire, avant que les taux de bilirubine ne soient modifiés.

Etudiant les effets toxiques au niveau du foie de divers agents chimiques, en essais aigus, nous avons été intéressés essentiellement par les lésions primaires, au niveau de l'hépatocyte, qui sont susceptibles d'être provoquées, c'est-à-dire une modification de la perméabilité cellulaire.

Nous avons été ainsi amenés à déterminer, au cours de notre expérimentation, parallèlement aux méthémoglobinémies, les taux de :

- transaminases sériques S. G. O. T.
- Lactico-deshydrogénases (L. D. H.)
- aldolases.

Egalement, nous avons dosé, dans les mêmes conditions, les phosphatases alcalines qui permettent de juger d'un trouble éventuel de la sécrétion biliaire.

Ces tests présentent tous l'avantage d'une très grande sensibilité, ce qui nous a autorisés, opérant sur la souris, à n'utiliser que des microprises d'essai (10 à 50 μ l).

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE II - I -

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

II - I - I Espèce animale -

Il est bien connu que l'homme et les animaux, notamment les animaux de laboratoire, présentent des sensibilités très variables, d'une espèce à l'autre, aux divers agents methémoglobinisants. La variabilité des réponses, en fonction de l'espèce, a été mise en évidence par SZIGHETTI (91), dès 1893.

Etudiant l'activité methémoglobinisante de l'acétanilide (0,40 millimol par Kg, administrée par voie orale), LESTER (56) a pu établir, en fonction de l'espèce, une échelle de sensibilité, dont les valeurs relatives sont résumées dans le tableau II suivant :

Espèce animale	Réponse donnée par l'animal	Sensibilité
Chat	100	I
Homme	50 à 60	0,5 à 0,6
Chien	30	0,3
Rat	4 à 6	0,05

Tableau II : - Sensibilités comparées de l'homme et de quelques animaux de laboratoire à l'activité methémoglobinisante de l'acétanilide, selon LESTER (56).

Il en ressort que, le chat excepté, les petits animaux de laboratoire ont une sensibilité aux agents methémoglobinisants réellement plus faible que celle observée chez l'homme.

Le rat, en particulier, serait environ dix fois moins sensible, et des essais préliminaires, effectués au laboratoire, nous ont permis de constater que la souris présente, dans ce domaine, une sensibilité très voisine, sinon identique, à celle du rat.

Cependant, notre choix s'est porté sur la souris, espèce animale qui présente un certain nombre d'avantages.

Elle est d'un maniement aisé, et il est possible de constituer des lots d'animaux d'une importance suffisante pour permettre de tirer des résultats des valeurs statistiquement valables. Enfin, il est assez facile de constituer, dans nos animaleries, des lots parfaitement homogènes, et représentant une population relativement importante de souris, en raison des possibilités d'élevage et du prix de revient modeste d'un tel animal.

La souris n'a pas que des avantages, pour une telle expérimentation et, en particulier, son utilisation implique la mise au point de techniques de micro-analyse des différents composants sanguins, que nous avons été amenés à doser (methémoglobine, enzymes circulants).

Nous nous sommes efforcés, au cours de l'expérimentation, d'utiliser une population animale homogène. Les souris employées, répondaient à trois critères :

- la souche : souris Swiss, albinos ; mâle, adulte,
- l'âge : souris âgées de deux à quatre mois,
- le poids : les animaux avaient un poids de 20 ± 3 g.

Dès leur arrivée au laboratoire, les souris étaient groupées par lots de dix animaux, dans des cages métalliques.

Au moment de l'essai, les animaux étaient accoutumés, depuis au moins quinze jours, aux conditions de vie au laboratoire (Provenance M 25 Extralabo, eau de boisson ad libitum - température de l'animalerie : $23 \text{ degrés} \pm 2$).

II - 1 - 2 - Les agents expérimentés -

Tous les produits utilisés sont d'origine commerciale (réactifs purs ou purissimus garantis à 99,9 %, Prolabo, Merck).

En fonction du produit expérimenté, le solvant adopté a été :

- l'eau distillée
- une solution aqueuse tamponnée (tampon phosphate de Soerensen M/15 à pH compris entre 4 et 5,) pour les produits solubles en milieu acide.
- l'huile de tournesol, pour les composés insolubles dans l'eau, et solubles dans les lipides (tetrachlorure de carbone, bromobenzène...)

Dans tous les cas, les concentrations ont été calculées de façon à injecter un volume constant de 0,5 ml de solution par souris (25 ml/Kg).

II - I - 3 - Mode d'injection -

Nous avons choisi la voie sous-cutanée. Il a été injecté, à chaque souris, 0,5 ml de solution, à l'aide d'une seringue de un ml graduée en centième de millilitre.

II - I - 4 - Conduite des essais -

Pour chaque produit, l'expérimentation a été menée de la façon suivante :

- étude de l'activité méthémoglobinisante et de l'atteinte hépatique, en fonction du temps, à une dose constante (100 mg/Kg). Ces essais nous ont permis de déterminer l'intervalle de temps qui donne une intoxication maximale, pour une dose donnée,
- étude de la courbe dose-action, dans les conditions expérimentales conduisant à un effet maximal.

II - I - 5 - Prélèvement -

Chez la souris, la volémie est comprise entre 1,3 et 1,4 ml (1/15ème du poids du corps). Les prélèvements de sang n'ont donc pu être effectués qu'en sacrifiant l'animal, soit par décapitation, soit par ponction cardiaque.

Le sérum a été recueilli après centrifugation du sang total prélevé dans des petits tubes en matière plastique, * à l'aide d'une pipette Pasteur. Il a servi au dosage des enzymes sériques.

Le sang total (0,4 ml) nécessaire au dosage de l'hémoglobine et des pigments apparentés, a été immédiatement laqué dans un tampon phosphate de Sørensen.

II - I - 6 - Dosages -

L'hémoglobine totale et la méthémoglobine ont été dosées à l'aide de la technique d'Evelyn et Malloy (30).

Les tests enzymatiques choisis pour juger d'une atteinte hépatique, la mesure des transaminases, des phosphatases alcalines, de la lactico-deshydrogenase et de l'aldolase du sérum, ont été pratiqués à l'aide des trousseaux de réactifs actuellement commercialisés, **

* Matériel Spinco d'ultra micro-analyse.

** Biolyon ou Boehringer.

II - I - 7 - Expression des résultats -

Opérant sur des lots de dix animaux, chaque résultat a porté sur dix mesures individuelles, ce qui nous a permis de déterminer :

- la moyenne M
- l'écart-type σ
- l'erreur-type, par
rapport à la moyenne
ou écart-type approché } E

Les résultats sont exprimés systématiquement, par $M \pm \sigma$
(68 % des cas) et $M \pm 2 \sigma$ (95 % des cas).

CHAPITRE II - 2 -

TECHNIQUES ANALYTIQUESII - 2 - I - DOSAGE de la METHEMOGLOBINE et de l'HEMOGLOBINE
TOTALE - TECHNIQUE d'EVELYN et MALLOY - (30).

Cette technique spectrophotométrique permet de doser simultanément:

- l'hémoglobine totale,
- la méthémoglobine formée.

Généralement préconisée comme technique de référence, elle implique l'emploi d'un spectrophotomètre sensible, muni d'un bon monochromateur.

Principe -

a) dosage de la méthémoglobine :

La bande d'absorption caractéristique de la méthémoglobine, à 635 $m\mu$, disparaît presque complètement lorsque celle-ci est transformée en cyanométhémoglobine, par action de cyanure de sodium ou de potassium.

Les différences entre les deux densités optiques, observées avant et après addition de cyanure au milieu, sont directement proportionnelles au taux de méthémoglobine dans la solution à doser.

b) dosage de l'hémoglobine totale :

En oxydant par le ferricyanure de potassium l'hémoglobine en méthémoglobine, puis en transformant cette dernière en méthémoglobine cyanée, tous les pigments se trouvent ainsi transformés en méthémoglobine cyanée, dont le maximum d'absorption se trouve à 540 $m\mu$.

La densité optique de la solution, à cette longueur d'onde, permet de déduire directement la concentration en hémoglobine totale de la solution à doser.

Réactifs -

I) Mélange tampon de Sørensen : mélange 0,067 M donnant un pH de 6,6

Il est obtenu en mélangeant :

- 64 ml de solution de phosphate monopotassique à 9,078 g/l.

- 36 ml de solution de phosphate disodique à 11,876 g/l.

- 2) Tampon 0,016 M : obtenu par dilution du précédent.
- 3) Solution de ferricyanure de potassium à 20 %
- 4) Solution de cyanure de sodium à 10 %
- 5) Solution neutralisée de cyanure de sodium, préparée en mélangeant à parties égales :
 - solution de cyanure de sodium à 10 %
 - solution d'acide acétique à 12 %

Cette solution doit être préparée extemporanément.

De plus, il est préférable de vérifier, au moment de l'emploi, que le pH obtenu est bien le même que celui du mélange tampon de Sørensen, c'est-à-dire 6,6.

Mode Opératoire -

Prélevé par décapitation chez la souris, le sang est immédiatement laqué, à raison de 0,4 ml dans 10 ml de tampon O,016 M. Si la solution n'est pas absolument limpide, centrifuger.

a) dosage de la méthémoglobine. :

Après cinq minutes de contact, faire une lecture à 635 $m\mu$; soit L_1 la densité optique obtenue.

Ajouter alors à la solution une goutte de solution de cyanure de sodium, neutralisée. Attendre deux minutes et faire une nouvelle lecture à 635 $m\mu$; soit L_2 la nouvelle lecture.

La différence $L_1 - L_2$ est directement proportionnelle à la concentration en méthémoglobine.

b) dosage de l'hémoglobine :

Diluer 2 ml de la solution précédente, à 1/25 dans 8 ml de tampon phosphate O,067 M. Ajouter une goutte de ferricyanure de potassium et attendre deux minutes, temps nécessaire pour oxyder quantitativement l'hémoglobine en méthémoglobine.

Ajouter une goutte de solution neutralisée de cyanure de sodium et attendre, à nouveau, deux minutes.

Déterminer la teneur de la solution en cyanométhémoglobine totale, en mesurant la densité optique, à 540 $m\mu$, soit L_3 .

Le témoin est réalisé par 10 ml de solution tampon, contenant une goutte de solution de ferricyanure.

Calculs -

Nous avons étalonné le spectrophotomètre * dont nous avons pu disposer pour cette étude, à l'aide d'une solution pure titrée d'hémoglobine, ce qui nous a permis d'établir les équations suivantes :

$$\left. \begin{array}{l} \text{Hémoglobine en grammes} \\ \text{pour} \\ 100 \text{ ml de sang} \end{array} \right\} = \frac{100 \times L_3}{5,26}$$

$$\left. \begin{array}{l} \text{Méthémoglobine en grammes} \\ \text{pour} \\ 100 \text{ ml de sang} \end{array} \right\} = \frac{(L_1 - L_2) 100}{7,33}$$

Précision -

Dans les conditions de l'essai, l'erreur est, au plus, égale à 0,2 pour cent.

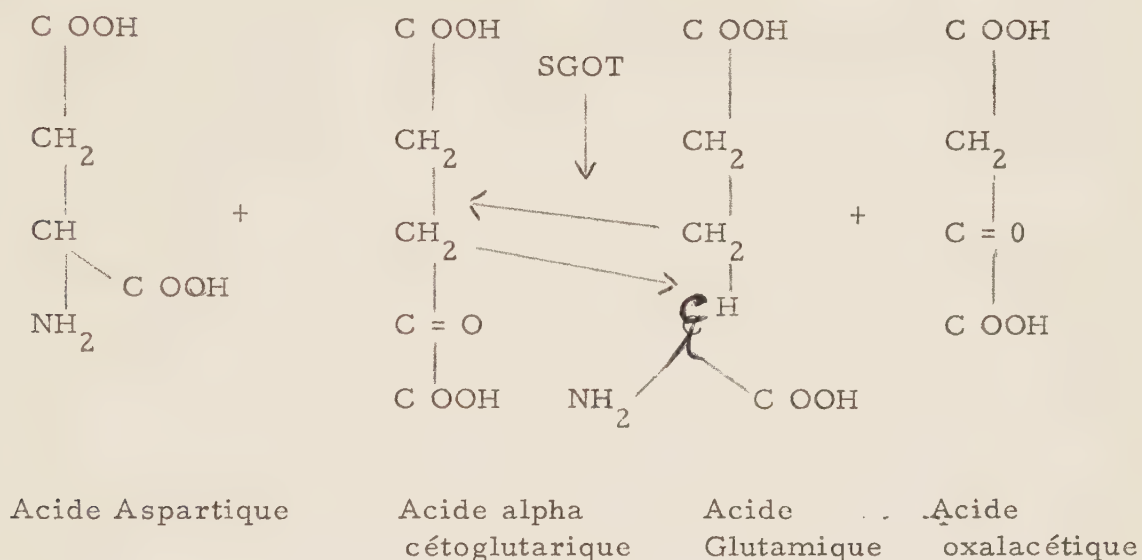
Tous nos résultats ont été exprimés en grammes de méthémoglobine pour 100 ml de sang, et en pour cent de l'hémoglobine totale.

* Jobin et Yvon, type Maroc.

II - 2 - 2 - DOSAGE de la TRANSAMINASE GLUTAMIQUE OXALACETIQUE SERIQUE (S.G.O.T.) -(77)

Principe

La transaminase glutamique oxalacétique (S.G.O.T.) catalyse le transfert réversible d'un groupement aminé, sur un acide alpha cétonique, aboutissant ainsi à la synthèse d'un nouvel acide aminé et d'un nouvel acide cétonique ; le schéma réactionnel est le suivant :



Produit final de la réaction enzymatique, l'acide oxalacétique donne ensuite, par décarboxylation, l'acide pyruvique qui réagit avec la dinitrophenylhydrazine, pour former la dinitrophenylhydrazone pyruvique. Cette dernière, en présence de soude, donne une coloration jaune, dont l'intensité est déterminée après trente minutes à 505 mμ.

Réactifs ^x

1) Solution de substrat GOT, à base de :

- phosphate (tampon 0,1 M, pH 4).
- cétoglutarate à 2 mM
- ~~L~~asparginate.

Ce réactif est à conserver à la glacière.

2) Solution de dinitrophenylhydrazine : 1 mM

Ce réactif doit être conservé dans une bouteille brune, à la glacière.

3) Solution étalon : solution de pyruvate de sodium, préparée avec :

- pyruvate de sodium 33 mg,
- tampon phosphate (0,1 M, pH 4) q s p 100 ml.

4) Solution de soude à 22 g/l.

Définition de l'unité enzymatique (unité de transaminase

μ Ez GOT color)

L'unité internationale μ Ez GOT color est définie comme l'activité de 1 ml de sérum qui, en une minute, donne lieu à la formation d'un chromogène équivalent à 1 μ M de pyruvate.

Mode opératoire -

1) Etalonnage - Préparer des dilutions suivantes :

Numéros des tubes	Etalon en ml (Réactif N° 3)	Substrat GOT en ml (Réactif n° 1)	Unités correspondantes.
0 = témoin	0	1	0
1	0,1	0,9	25
2	0,2	0,8	50
3	0,3	0,7	75
4	0,4	0,6	100

Prendre 50 μ l de chaque dilution et introduire dans des tubes contenant 10 μ l d'eau distillée. Ajouter 50 μ l de dinitrophenylhydrazine et attendre vingt minutes. Ajouter 150 μ l de soude et lire, après trente minutes, à 505 $m\mu$.

2) Dosage - Mélanger :

- 25 -

- Réactif I : solution)
substrat GOT (50 $\mu\ell$ - laisser au bain-marie, à 37°, quelques minutes
- Prélèvement 10 $\mu\ell$ - laisser au bain-marie, à 37° exactement 60 minutes.
- Réactif 2 : solution de)
dinitrophe- (50 $\mu\ell$ - laisser reposer 20 minutes.
nylhydrazine)
- Réactif 4 : solution de)
soude à 22 g/l { 150 $\mu\ell$ - centrifuger, si nécessaire;

Après trente minutes de repos, la densité optique de la solution est mesurée à 505 $m\mu$, le témoin permettant d'établir l'absorption de base.

Calculs -

Se reporter à la courbe d'étalonnage, pour déterminer le nombre d'unités SGOT par millilitre.

Remarques -

1) - Il est nécessaire de diluer le sérum, à 1/5ème ou à 1/10ème, avec de l'eau physiologique, pour une activité supérieure à 70 unités μ Ez GOT color.

2) - Stabilité de la coloration : nous avons fait des essais toutes les cinq minutes, et nous avons conclu que la coloration est stable après cinq minutes, et le reste pendant une heure.

3) - L'activité est identique dans le sérum et le plasma. Les prélèvements peuvent être éventuellement pratiqués sous anticoagulants.

Par contre, toute trace d'hémolyse rend le dosage inutile : la libération de l'enzyme contenu dans les hématies augmente jusqu'à dix fois (sans laqué) le nombre d'unités SGOT par ml.

II - 2 - 3 - DOSAGE des PHOSPHATASES ALCALINES SERIQUES (4)

Principe -

Les phosphatases catalysent la coupure hydrolytique des esters phosphoriques.

Le substrat utilisé est le paranitrophenylphosphate.

Après hydrolyse de la liaison ester, on peut mesurer, en milieu alcalin, la coloration jaune du paranitrophénol libéré. La cinétique de la réaction est proportionnelle à l'activité phosphatasique de l'échantillon soumis à l'analyse.

Réactifs - *

1) Solution tampon - substrat :

- a) solution tampon de pH 10,5 10 ml
 - glycocolle 5×10^{-2} M
 - chlorure de magnésium 5×10^{-4} M
- b) substrat (paranitrophénylphosphate de sodium) 15 mg
(tablettes dosées à 15 mg)

2) Solution de soude à 0,02 N.

Définition de l'unité enzymatique (unité phosphatasique Bessey)

L'unité Bessey (4) est définie comme étant la quantité d'enzyme contenue dans un litre de sérum, qui libère, en une heure, à 37°, 1 m Mol, soit 140 mg de paranitrophénol.

Mode opératoire -

Dans deux tubes à hémolyse, introduire successivement, comme il est indiqué ci-après, en agitant à chaque addition. :

* Nous avons utilisé ici les réactifs Boehringer.

Réactifs	Essai	Témoin
Solution de Substrat tamponnée	0,5 ml	0,5 ml
Sérum	0,05 ml	-
(Maintenir trente minutes, au bain-marie, à 37°).		
Sérum	-	0,05 ml
Soude à 0,02 N	5 ml	-

Lire les deux densités optiques à 405 $m\mu$, le zéro de l'appareil étant réalisé à l'aide de la solution de substrat tamponnée.

Calculs -

A pH 11,5 et à 405 $m\mu$, une unité phosphatasique correspond à une densité optique de 0,084.

Si la différence de densité optique entre le tube dosage et le tube témoin, mesurée dans ces conditions, est de ΔE , le nombre d'unités phosphatasiques, en unités Bessey, est donné par le calcul très simple suivant :

$$\frac{\Delta E}{0,084} = \boxed{12 \Delta E}$$

Remarques -

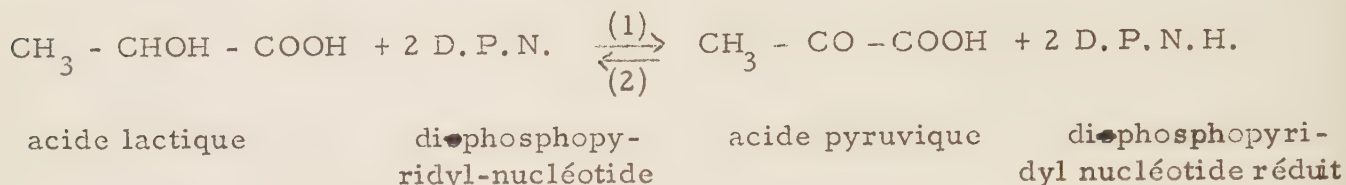
1) - En raison du manque de stabilité de l'enzyme, une telle détermination n'est significative que si le dosage est pratiqué sur sérum frais.

2) - Pour les sérums contenant plus de 6 unités phosphatasiques par millilitre, il est nécessaire de diluer convenablement l'échantillon et de refaire un nouveau dosage.

II - 2 - 4 - DOSAGE de la LACTICO-DESHYDROGENASE SERIQUE (L.D.H.) (100)

Principe -

La lactico-deshydrogenase (L.D.H) catalyse la réaction de transfert de l'hydrogène :



Dans les conditions expérimentales adoptées, cette réaction n'est pas équilibrée, mais s'effectue dans le sens (2) (oxydation du D.P.N.H.).

Lorsqu'on ajoute à une solution de L.D.H. une solution de pyruvate et de D.P.N.H., la cinétique de la réaction $\text{D.P.N.H.} \rightarrow \text{D.P.N.}$ est fonction de la concentration en L.D.H. du milieu. Cette réaction est suivie par spectrophotomètre, à 340 $m\mu$, le D.P.N.H. étant plus absorbant que le D.P.N. à cette longueur d'onde.

Réactifs - *

1) Solution tamponnée de pyruvate de sodium qui se compose de :

- pyruvate de sodium $3,1 \times 10^{-4} \text{ M}$
- tampon phosphate 0,05 M ph 7,5

Il y a avantage à additionner le réactif de 0,2 ml de chloroforme, pour augmenter sa durée de conservation.

2) Solution de D.P.N.H. (disphosphopyridylnucléotide réduit) à $8 \times 10^{-3} \text{ M}$

*

Nous avons utilisé les réactifs Boehringer pour ce dosage.

Définition de l'unité employée : unité Wroblewski -

D'après Wroblewski et La Due, (100) une unité Wroblewski de L.D.H. est la quantité de lactat-deshydrogenase contenue dans un millilitre de sérum qui, à 24-27 degrés et à 340 $m\mu$, dans un volume de 3 millilitres, modifie l'extinction du D.P.N.H. de 0,01 en une minute.

Mode opératoire -

Les réactifs et le sérum étant portés à 25 degrés par un maintien de quelques minutes au bain-marie, introduire successivement, dans un tube à essai :

- solution tamponnée de pyruvate de sodium,	2,85 ml,
- solution de D.P.N.H.	0,05 ml,
- sérum	0,10 ml.

Mélanger avec un agitateur en plastique. Suivre l'évolution de la densité optique du milieu réactionnel à 340 $m\mu$ chaque minute, pendant trois à cinq minutes.

Etablir ainsi sur 4 ou 5 mesures, la diminution moyenne de l'extinction par minute, pour obtenir la diminution ΔE pendant une minute.

Calculs -

Unités Wroblewski, par
millilitre de sérum

$$= \Delta E \quad \frac{340 m\mu}{1 \text{ minute}} \times 10.000$$

Remarques -

1) - En raison de l'instabilité de l'enzyme et de sa concentration dans les hématies, une telle détermination ne peut être réalisée que sur un sérum frais et non hémolysé.

2) - Les variations de densité optique, en une minute, ne doivent pas dépasser 0,2. Dans le cas contraire, il est nécessaire de diluer le sérum avec la solution tamponnée de pyruvate de sodium.

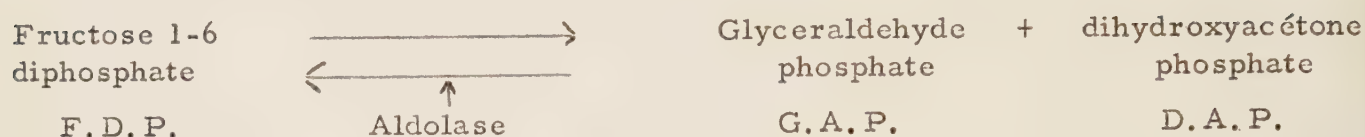
3) - On peut transformer les unités Wroblewski en unités internationales, en utilisant le facteur 0,48.

4) - Il est également possible de suivre les variations de la densité optique à 366 $m\mu$, mais il faut alors multiplier les résultats, par le coefficient 1,89.

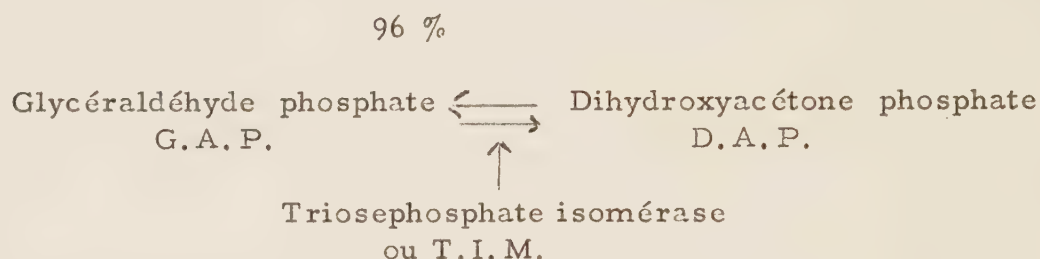
II - 2 - 5 - DOSAGE de l'ALDOLASE SERIQUE (88)

Principe -

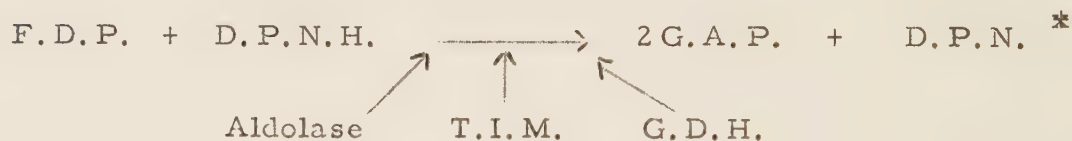
L'aldolase catalyse la réaction :



Les deux triosephosphates ainsi formés sont dans un équilibre enzymatique catalysé par une triosephosphate isomerase, tel que 96 % de dihydroxyacétonephosphate est déplacé spontanément par un excès de triosephosphate isomérase :



La réaction globale s'écrit :



Au cours de la réaction, il y a disparition simultanée de F.D.P et de D.P.N.H., ce qui va provoquer une diminution de densité optique ; celle-ci est directement proportionnelle à l'activité de l'aldolase.

*
 D.P.N. = Diphosphopyridyl -nucléotide
 D.P.H.H. = Diphosphopyridil-nucléotide réduit
 G.D.H. = Glycerophosphate deshydrogenase.

Réactifs - *

1) Solution de Fructose I-6 diphosphate tamponnée à pH 7,4 par de la collidine ; elle se compose de :

- 2-4-6 triméthylpyridine ou collidine 0,056 M
- monoiodoacétate de sodium $3 \cdot 10^{-4}$ M
- fructose I-6 diphosphate $2 \cdot 10^{-3}$ M

2) Solution de diphosphopyridyl-nucléotide (D.P.N.H.) à $1,5 \cdot 10^{-2}$ M

3) Solution de glycerophosphate déshydrogénase (G.D.H.) à 2 mg/ml et de triphosphosphate isomérase (T.I.M)

Définition de l'unité enzymatique : unité Bruns

Une unité d'aldolase, d'après Bruns (9) correspond à l'activité de un millilitre de sérum hydrolysant I μ l de fructose I-6 diphosphate, en une heure à 37°.

Mode opératoire : -

Dans un tube à essai, mettre successivement, en agitant après chaque addition :

- 2,74 ml de solution tamponnée de fructose I-6 diphosphate
- 0,05 ml de solution de D.P.N.H.
- 0,01 ml de solution de G.D.H. - T.I.M.
- 0,2 ml de sérum.

Placer à 37° la réaction démarre immédiatement. Après 5 à 10 minutes, lire au photomètre à 366 m μ , le témoin étant constitué par 0,2 ml de sérum et 2,8 ml d'eau distillée.

Noter l'heure et la valeur E_1 .

Remettre le contenu de la cuve dans le tube à essai et laisser à 37° vingt minutes exactement. Photométrer à nouveau, ce qui donne la valeur E_2 .

La variation d'extinction, après vingt minutes d'incubation, $E_1 - E_2 = \Delta E$ est proportionnelle à l'activité aldolasique du sérum.

Calculs -

Pour un millilitre de sérum, une différence de 0,1 de densité optique à 366 m μ en une heure, correspond à 1,02 unité d'aldolase.

Pour 0,2 ml de sérum, pendant vingt minutes, une différence de 1 dans la densité optique correspond à :

$$\frac{1,02 \times 10}{1/3 \times 1/5} = 1,02 \times 10 \times 3 \times 5 = 153$$

D'où taux d'aldolases en unités Bruns : $\Delta E \times 153$

Remarques -

Les remarques formulées à la fin de l'exposé des techniques du dosage de l'activité phosphatasique du sérum, sont également valables ici.

II - 2 - 6 - LES MESURES de la DENSITE OPTIQUE -

Pour toutes les techniques dont nous venons de rappeler les principes et les conditions d'application, il est nécessaire d'utiliser un spectrophotomètre.

Nous avons eu la possibilité de faire appel à deux types d'appareils :

- le spectrophotomètre Marc (Jobin et Yvon), appareil à la fois fidèle, précis et sensible, que nous avons systématiquement utilisé pour doser les méthémoglobinémies.

- l'appareillage d'ultra-microanalyse de Beckmann Spinco, qui présente l'avantage de pouvoir utiliser des ultra-microméthodes, avec des prises d'essai de 5 à 50 μ l au prix inévitablement d'une précision légèrement inférieure mais encore très acceptable ($\pm$ 5 %) pour les dosages enzymatiques.

CHAPITRE II - 3 -

R E S U L T A T S

Nous avons étudié selon le protocole expérimental décrit précédemment l'activité méthémoglobinisante et la toxicité hépatique des composés suivants :

- Acétanilide
- Aniline
- β Naphtol
- Bromobenzène
- Chlorate de potasse
- Isoniazide
- Naphtylamine
- Nitrite de sodium
- Nitrobenzène
- Orthoaminophénol
- Ortho-Crésol
- Paraaminophénol
- Paraaminophénol acétylé
- Phénacétine
- Phenétidine
- Phenylhydrazine
- Tetrachlorure de carbone
- Thymol
- Triéthylamine
- Xylidine.

Pour les principaux d'entre eux, notamment le nitrite de sodium, l'aniline, l'acétanilide, le tetrachlorure de carbone, les résultats portent sur les variations des taux de méthémoglobine par rapport à l'hémoglobine totale :

- en fonction du temps (tableau III, figures 3 et 4)
- en fonction de la dose administrée (tableau IV, figure 5).

D'après ces données expérimentales, l'évolution de la méthémoglobinémie est assez parallèle pour tous les produits étudiés.

Comme le montrent les figures 3 et 4, les valeurs maximales sont atteintes dans tous les cas une heure après l'injection sous-cutanée du toxique. Il n'a jamais été observé d'effets différés.

Avec l'aniline, choisie comme substance test, on note en outre une relation directe entre les taux de méthémoglobine et les doses injectées lorsque celles-ci sont comprises entre 20 et 100 mg/Kg. Au delà de cette dose, pour l'aniline comme pour le nitrite de sodium (figure 5), les méthémoglobinémies n'augment plus que de façon très limitée.

Ces observations nous ont amenés à comparer l'activité méthémoglobini-sante de tous les composés étudiés dans les conditions expérimentales suivantes :

- dose administrée 100 mg/Kg, voie sous-cutanée,
- durée d'intoxication une heure.

Le tableau V réunit les résultats obtenus pour chaque série expérimentale ainsi que les valeurs statistiques que l'on peut en déduire (un lot homogène de dix souris a été utilisé pour chaque dosage).

Le tableau VI et la figure 6 résument l'ensemble de nos résultats pour tous les composés expérimentés.

Objectivant le degré d'atteinte hépatique, les variations des transamina-sémies en fonction de la durée de l'essai sont rapportées dans le tableau VII.

On constate que dans tous les cas où il est noté une hyper-transaminasémie les valeurs maximales sont atteintes dans la quinzième heure qui suit l'injection (figure 7).

Des essais préalables nous ayant permis de constater, quel que soit l'agent toxique, un parallélisme étroit dans l'évolution des tests enzymatiques choisis, toutes les déterminations ont été effectuées, comme pour les transami-nases à la quinzième heure de l'essai.

Le tableau VIII et la figure 8 rendent compte des variations observées, après quinze heures, dans le cas de l'aniline (de 50 à 500 mg/Kg), pour les quatre enzymes choisis. * On constate une augmentation significative des transaminases dès la dose d'aniline correspondant à 50 mg par Kg corporel.

Par contre, les taux des autres enzymes - phosphatases alcalines, lactico-deshydrogenases - n'augmentent que faiblement, les variations n'étant significatives que lorsqu'on dépasse des doses de 100 mg par Kg, et en ce qui concerne les aldolases, on note une diminution sensible de la teneur du sérum qui, pour des doses de 500 mg/Kg, ne correspond plus qu'à environ le dixième des valeurs témoin.

* Comme nous l'avons rappelé plus haut, les hyperenzymémies reflètent de façon relativement spécifique, une atteinte de la perméabilité cellulaire au niveau de l'hépatocyte. Les tests choisis sont donc parfaitement valables pour objectiver une atteinte hépatique aigüe au premier stade de l'intoxication.

Quelques auteurs (16, 26) ont cependant signalé une élévation du fer sérique à la suite d'intoxications par l'aniline et d'autres agents toxiques. Ces données nous ont conduits à déterminer les variations des taux de fer sérique dans les conditions expérimentales ; toutefois cet essai a été pratiqué chez le rat en raison du volume de serum nécessaire pour ce dosage. Le fer sérique a été dosé à l'aide de la technique de HEMMELER (42), chez des animaux intoxiqués par 250 mg/Kg d'aniline (voie sous-cutanée). Dans les conditions de l'essai, il n'a été trouvé aucune différence entre les sidérémies des animaux témoins et intoxiqués (2 mg + 0,2 par litre). Un tel résultat n'est pas surprenant : un fer sérique fortement augmenté témoigne d'une cytolysé de l'hépatocyte, et ne s'observe en général qu'au cours d'une intoxication chronique, grave, ce qui n'est pas le cas dans nos conditions expérimentales.

Ces résultats démontrent l'intérêt particulier qui s'attache aux déterminations des transaminasémies au cours d'une telle atteinte hépatique, et justifient que nous ayons dosé uniquement des transaminases S. G. O. T. au cours de nos essais ultérieurs.

Le tableau IX et la figure 9 rendent compte des hypertransaminasémies observées en fonction de la dose injectée sous l'effet des divers agents toxiques le tetrachlorure de carbone, le bromobenzène, l'aniline et la triéthylamine.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'hépto-toxicité quasi spécifique du tetrachlorure de carbone dès la dose de 50 mg/Kg les transaminasémies étant environ six fois plus élevées avec cet agent qu'avec l'aniline à des doses correspondantes.

On peut noter également l'absence d'hépto-toxicité, contrairement à l'aniline, d'une amine aliphatique la triéthylamine.

L'ensemble de nos résultats est présenté dans les tableaux X et XI et la figure 10.

Dans le tableau X figurent les données expérimentales obtenues pour chaque agent étudié sur un lot homogène de dix souris, ainsi que les données statistiques que l'on peut tirer de ces résultats.

Le tableau XI et la figure 10 résument l'ensemble de ces résultats en fonction des taux de transaminases sériques obtenus, à la dose 100 mg/Kg et après quinze heures d'intoxication ; ces taux sont exprimés ici par leur moyenne et l'écart-type qui leur correspond.

Agent toxique		1/2 heure	1 heure	2 heures	4 heures	15 heures	24 heures	48 heures	72 heures
Nitrite de sodium	Methb	26,5 $\pm$ 6,3	20,5 $\pm$ 4,50	19,3 $\pm$ 4,	1,2 $\pm$ 0,30	-	-	-	-
	Hb	73,5 $\pm$ 3,6	71,5 $\pm$ 2,25	80,7 $\pm$ 3	98,8 $\pm$ 4,16	-	-	-	-
Aniline	Methb	13,1 $\pm$ 2,4	20 $\pm$ 1,23	8,5 $\pm$ 2,85	5,7 $\pm$ 0,56	1,4 $\pm$ 0,48	1,3 $\pm$ 0,45	0,91 $\pm$ 0,3	0,81 $\pm$ 0,28
	Hb	86,9 $\pm$ 3,3	80 $\pm$ 5,70	91,5 $\pm$ 6,60	9,43 $\pm$ 6,16	98,6 $\pm$ 6,45	98,7 $\pm$ 9	99,1 $\pm$ 9,6	99,2 $\pm$ 0,51
Nitro benzène	Methb	-	7 $\pm$ 3,90	2,5 $\pm$ 1,80	-	-	-	-	-
	Hb	-	93 $\pm$ 2,20	97,5 $\pm$ 3,12	-	-	-	-	-
Xylidine	Methb	-	6,4 $\pm$ 1,70	5,8 $\pm$ 1,28	4,6 $\pm$ 0,54	1,41 $\pm$ 0,45	1 $\pm$ 0,36	0,8 $\pm$ 0,3	-
	Hb	-	93,6 $\pm$ 4,5	94,2 $\pm$ 3,20	95,4 $\pm$ 4,45	98,59 $\pm$ 3,6	99 $\pm$ 3	99,2 $\pm$ 3,9	-
Phenyl hydrazine	Methb	-	3,7 $\pm$ 0,68	1,70 $\pm$ 0,90	-	-	-	-	-
	Hb	-	96,3 $\pm$ 10	98,3 $\pm$ 3,45	-	-	-	-	-
Acetamidide	Methb	-	3,2 $\pm$ 0,75	2,6 $\pm$ 0,48	1,4 $\pm$ 0,32	-	-	-	-
	Hb	-	96,8 $\pm$ 4,80	97,4 $\pm$ 4,80	98,6 $\pm$ 5,45	-	-	-	-
Tétrachlorure de carbone	Methb	0,9 $\pm$ 0,28	2 $\pm$ 1,13	1,3 $\pm$ 0,20	1,1 $\pm$ 0,26	-	-	-	-
	Hb	99,1 $\pm$ 3,1	98 $\pm$ 2,64	98,7 $\pm$ 4,50	98,9 $\pm$ 3,20	-	-	-	-

Tableau III : Variations de la méthémoglobininémie (Methb) et de l'hémoglobininémie (Hb), en fonction du temps, sous l'effet de quelques agents méthémoglobinisants, à la dose de 100 mg/Kg s.c., chez la souris.

N.B. - Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'hémoglobine totale, avec la moyenne, plus ou moins l'écart-type.

Agent toxique		100 mg/Kg	200 mg/Kg	500 mg/Kg
Nitrite de sodium	Methb	28,5 $\pm$ 4,5	30 $\pm$ 7,75	35 $\pm$ 8,4
	Hb	71,5 $\pm$ 2,25	70 $\pm$ 6,45	65 $\pm$ 6,9
Aniline	Methb	20 $\pm$ 1,23	-	23 $\pm$ 3,9
	Hb	80 $\pm$ 5,7	-	77 $\pm$ 6,6
Acetanilide	Methb	3,2 $\pm$ 0,75	-	-
	Hb	96,8 $\pm$ 4,8	-	-
Tetrachlorure de carbone	Methb	2 $\pm$ 1,13	0,95 $\pm$ 0,38	1 $\pm$ 0,36
	Hb	98 $\pm$ 2,64	99,05 $\pm$ 6,9	99 $\pm$ 5,4
Bromobenzène	Methb	0,82 $\pm$ 0,33	-	0,85 $\pm$ 0,25
	Hb	99,18 $\pm$ 3,6	-	99,15 $\pm$ 9

Tableau IV : Variations de la méthémoglobininémie (Methb) et de l'hémoglobininémie (Hb) chez la souris, sous l'effet de quelques agents méthémoglobinisants, en fonction de la dose injectée, après une heure d'intoxication.

Agent toxique		Nitrite de sodium		Aniline		Nitrobenzène		Xylidine		Paraaminophenol	
		Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb
Numéros des animaux	1	3,7	13,1	2,8	12,7	0,7	11,6	0,84	12	0,82	12,7
	2	4,1	12,6	2,6	14,5	1,63	12	0,98	12,6	0,28	13
	3	3,7	11,8	2,7	13,1	0,42	12,6	0,98	11,7	0,95	12
	4	3,1	12	2,6	12,6	0,42	12	0,7	13,1	0,82	12,5
	5	3,3	12,3	2,3	12,7	0,98	12,5	0,84	13	1,1	12,8
	6	4,3	12,3	2,7	13,1	0,84	12	0,56	11,7	1,1	12,7
	7	2,3	12,7	2,7	13,6	0,42	12	0,56	11,8	1,65	12,5
	8	3,7	11,8	2,8	13,1	1,77	11,8	0,84	11,8	0,42	12
	9	3,7	12,3	2,6	12,6	0,7	12,	0,7	12,6	0,56	12
	10	3,4	12,7	-	-	1,26	12	-	-	0,42	12,7
Moyenne en g pour 100ml		3,5	12,4	2,6	13	0,84	12	0,78	12,2	0,80	12,5
Ecart-Type		0,56	0,42	0,16	0,63	0,502	0,3	0,159	0,58	0,39	0,37
Erreur-Type		0,18	0,13	0,053	0,31	0,157	0,094	0,053	0,19	0,122	0,12
Moyenne en % de l'hémoglobine totale		28,5	71,5	20	80	7	93	6,4	93,6	6,4	93,6
Ecart-Type		4,5	2,25	1,23	5,7	3,9	2,20	1,70	4,5	3,12	2,57
Erreur-Type		1,5	0,75	0,41	1,9	1,3	0,73	0,43	1,5	0,98	0,9

Tableau V : Methémoglobinémie (Methb) et hemoglobinémies (Hb) obtenues avec divers agents methémoglobinisants, chez la souris, à la dose de 100 mg/Kg, après intoxication de une heure.

Phenylhydrazine		Acetanilide		Chlorate de potasse		Thymol		Orthoaminophenol		Témoin	
Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb
0,7	15	0,49	12,6	0,68	11,6	0,42	12,7	0,28	12	0,2	13
0,42	14	0,28	13,5	0,28	12,3	0,14	11,8	0,28	11,70	0	12,3
0,42	12,4	0,35	11,8	0,56	11,8	0,28	12,3	0,42	12,6	0,14	13
0,42	12,3	0,35	13,1	0,28	12,7	0,28	12,3	0,14	13,1	0,2	13,2
0,56	11,6	0,49	11,8	0,28	12,3	0,28	12,7	0,28	11,7	0,07	13
0,42	11,6	0,49	12	0,14	12,7	0,28	11,8	0,14	11,8	0	13
0,42	14,8	0,42	11,8	0,42	11,6	0,28	12,7	0,28	12,6	0,2	13,2
0,42	11,6	0,42	12,6	0,28	11,8	0,42	12,3	0,28	11,7	0	14,3
0,56	13	0,28	11,8	0,14	12,7	0,28	12,6	0,42	13,1	0,14	13,7
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,48	12,9	0,39	12,2	0,31	12,2	0,3	12,3	0,28	12,2	0,11	13,2
0,102	1,36	0,086	0,61	0,18	0,48	0,08	0,37	0,10	0,6	0,084	0,55
0,03	0,45	0,029	0,203	0,06	0,16	0,028	0,125	0,033	0,2	0,028	0,18
3,7	96,3	3,2	96,8	2,7	97,3	2,4	97,6	2,3	97,7	0,83	99,17
0,68	10,00	0,75	4,8	1,44	3,84	0,66	3,6	0,80	4,8	0,66	4,08
0,23	3,33	0,25	1,6	0,48	1,28	0,22	1,2	0,27	1,6	0,22	1,36

N.B. - En ce qui concerne les valeurs témoins, nous en avons réalisé douze séries de dix animaux chacune, et nous avons vu que l'écart-type est suffisamment réduit, pour que nous ne citions ici, que les chiffres obtenus avec une série de dix animaux.

Agent toxique		Tetrachlorure de carbone		Paraaminophenol acétylé		Phenacetine		Naphtylamine		Triethylamine	
		Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb
Numéros des Animaux	1	0,42	12,6	0,14	12,6	0,28	12,3	0,14	12,3	0,14	11,6
	2	0,42	12,7	0,42	12	0	11,6	0,14	12	0,14	11
	3	0,28	12	0,28	12,7	0,14	12	0,28	12	0,07	12,7
	4	0	11,8	0,42	11,8	0,14	11,6	0,14	12	0,07	12,7
	5	0,28	12,6	0,14	12	0,28	11,8	0	12,3	0,07	13
	6	0,42	12	0,14	12,6	0,14	12,3	0,14	12,7	0,07	12
	7	0,14	12	0,28	12	0	11,8	0	12	0,14	12,5
	8	0,14	12	0,14	11,8	0,14	12,3	0,14	11,8	0,14	12,8
	9	0,14	11,8	0	12	0,14	12,7	0,14	12	0,14	13,1
	10	-	-	-	-	-	-	0	12,3	-	-
Moyenne en g pour 100 ml.		0,25	12,2	0,22	12,2	0,14	12	0,112	12,1	0,11	12,3
Ecart-type		0,143	0,34	0,14	0,37	0,10	0,36	0,09	0,27	0,037	0,72
Erreur-type		0,047	0,11	0,047	0,125	0,033	0,12	0,028	0,085	0,0123	0,24
Moyenne en % de l'hémoglobine totale		2	98	1,8	98,2	1,15	98,85	I	99	0,9	99,1
Ecart-type		1,13	2,64	1,14	3	0,81	2,88	0,74	2,21	0,32	2,98
Erreur-type		0,376	0,88	0,38	I	0,27	0,96	0,23	0,69	0,11	0,93

Tableau V : Methémoglobinémies (Methb) et hemoglobinémies (Hb) obtenues avec divers agents methémoglobinisants, chez la souris, à la dose de 100 mg/kg, après une intoxication de une heure.

Bromobenzène		Ortho-cresol		Isoniazide		β Naphtol		Phenctidine		Témoin	
Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb	Methb	Hb
0, 14	12, 3	0, 14	13, 1	0, 14	13	0, 14	12, 3	0, 14	12	0, 2	13
0, 07	11, 6	0	11, 8	0	13	0	11, 6	0	12, 5	0	12, 3
0, 14	11, 8	0	12, 3	0, 14	13, 2	0	11, 8	0	12, 7	0, 14	13
0, 07	12, 7	0	12, 7	0, 14	12, 3	0, 14	12, 3	0	11, 8	0, 2	13, 2
0, 07	12, 7	0, 28	12	0, 14	13	0	11, 8	0	12, 5	0, 07	13
0, 14	12, 3	0, 28	11, 8	0	13, 7	0	12	0, 14	11, 8	0	13
0, 14	11, 6	0	12, 6	0, 14	12, 3	0, 14	11, 8	0	12	0, 2	13, 2
0, 07	12, 3	0	12, 3	0	13	0	12, 3	0, 14	12, 7	0	14, 3
0, 07	11, 8	0, 14	12	0, 14	12, 3	0, 14	12, 3	0	12	0, 14	13, 7
-	-	-	-	-	-	-	-	-	;-	-	-
0, 10	12, 1	0, 1	12, 3	0, 093	12, 8	0, 06	12	0, 05	12, 2	0, 11	13, 2
0, 038	0, 44	0, 12	0, 45	0, 07	0, 49	0, 074	0, 29	0, 07	0, 38	0, 084	0, 55
0, 013	0, 147	0, 04	0, 15	0, 023	0, 16	0, 025	0, 097	0, 023	0, 13	0, 028	0, 18
0, 82	99, 18	0, 8	99, 2	0, 72	99, 28	0, 5	99, 5	0, 41	99, 59	0, 83	99, 17
0, 33	3, 6	0, 95	3, 6	0, 53	3, 75	0, 63	2, 42	0, 56	3, 18	0, 66	4, 08
0, 11	1, 20	0, 32	1, 20	0, 18	1, 25	0, 21	0, 81	0, 19	1, 06	0, 22	1, 36

N.B. - En ce qui concerne les valeurs témoins, nous en avons réalisé douze séries de dix animaux chacune, et nous avons vu que l'écart-type est suffisamment réduit, pour que nous ne citons ici que les chiffres obtenus avec une série de dix animaux.

N° d'ordre	Agent toxique	Pourcentage de méthémoglobine en fonction de l'hémoglobine totale.		
		M	$\pm$	σ
1	Nitrite de sodium	28,5	$\pm$	4,5
2	Aniline	20	$\pm$	1,23
3	Nitrobenzène	7	$\pm$	3,9
4	Xylidine	6,4	$\pm$	1,7
5	Paraaminophenol	6,4	$\pm$	3,12
6	Phenylhydrazine	3,7	$\pm$	0,68
7	Acetanilide	3,2	$\pm$	0,75
8	Chlorate de potasse	2,7	$\pm$	1,44
9	Thymol	2,4	$\pm$	0,66
10	Orthoaminophenol	2,3	$\pm$	0,80
11	Tetrachlorure de carbone	2	$\pm$	1,13
12	Paraaminophenol acétylé	1,8	$\pm$	1,14
13	Phenacetine	1,15	$\pm$	0,81
14	Naphtylamine	1	$\pm$	0,74
15	Triethylamine	0,9	$\pm$	0,32
16	Bromobenzène	0,82	$\pm$	0,33
17	Ortho - Cresol	0,8	$\pm$	0,95
18	Isoniazide	0,72	$\pm$	0,53
19	β Naphtol	0,5	$\pm$	0,63
20	Phenetidine	0,5	$\pm$	0,56
21	Témoin	0,83	$\pm$	0,66

Tableau VI : Classification des différents produits étudiés comme méthé moglobinisants, chez la souris, (dose injectée : 100 mg/Kg s.c. - durée d'intoxication, une heure).

Agent toxique	2 heures	4 heures	15 heures	24 heures	48 heures	72 heures
Tetrachlorure de carbone	67 $\pm$ 12,4	78 $\pm$ 18,7	602 $\pm$ 67	239 $\pm$ 51	138 $\pm$ 31	54 $\pm$ 9,9
Paraaminophenol	-		135 $\pm$ 18	84 $\pm$ 16	-	-
Bromobenzène	-	111 $\pm$ 18,7	128 $\pm$ 37	60 $\pm$ 9,3	-	-
Aniline	-	84 $\pm$ 11	113 $\pm$ 14	103 $\pm$ 13,4	61 $\pm$ 5	47 $\pm$ 14
Xylidine	-	75 $\pm$ 21	108 $\pm$ 8,9	96 $\pm$ 11,2	57 $\pm$ 7,3	46 $\pm$ 9
Orthoaminophenol	-	-	93 $\pm$ 12,4	77 $\pm$ 27,3	-	-
Paraaminophenol acétylé	-	-	88 $\pm$ 8,3	83 $\pm$ 7,8	-	-
β Naphtol	-	--	80 $\pm$ 20,8	64 $\pm$ 19,5	-	-
Acetanilide	-	70 $\pm$ 10,3	77 $\pm$ 19,5	56 $\pm$ 8,4	-	-
Ortho - Cresol	-	-	76 $\pm$ 28	54 $\pm$ 14,6	-	-
Nitrite de sodium	-	52 $\pm$ 10,8	50 $\pm$ 14,2	46 $\pm$ 7,4	-	-

Tableau VII : Variations de la transaminasémie, chez la souris,
(en unités $\sqrt{\text{Ez GOT color}}$) en fonction du temps, à la dose
de 100 mg/kg s.c.

N.B. - Les valeurs témoins déterminées sont de 45 $\pm$ 9 unités
 $\sqrt{\text{Ez GOT color}}$.

Enzymes sériques	Valeurs témoins	Doses d'Aniline expérimentées (voie s.c.)				
		50 mg/Kg	75 mg/Kg	100 mg/kg	200 mg/Kg	500 mg/Kg
Transaminases	45 $\pm$ 9	92 $\pm$ 13	95 $\pm$ 30,9	113 $\pm$ 14	-	130 $\pm$ 15,3
Phosphatases alcalines	3 $\pm$ 0,19	2,5 $\pm$ 1,1	3,1 $\pm$ 0,55	4,4 $\pm$ 1,35	-	6,2 $\pm$ 1,5
Lactico-des- hydrogenases	3070 $\pm$ 370	3600 $\pm$ 520	3800 $\pm$ 420	4000 $\pm$ 700	-	5200 $\pm$ 1200
Aldolases	87 $\pm$ 11	85,5 $\pm$ 11	-	72,6 $\pm$ 11	56 $\pm$ 10,5	9,5 $\pm$ 8,4

Tableau VIII.:

Action de l'aniline, sur quelques enzymes sériques, chez la souris, en fonction de la dose injectée, la durée d'intoxication étant de quinze heures.

Agent toxique	50 mg/Kg	75mg/Kg	100 mg/Kg	200 mg/Kg	500 mg/Kg
Tetrachlorure de carbone	-	-	602 $\pm$ 67	660 $\pm$ 73	790 $\pm$ 71
Bromobenzène	-	-	128 $\pm$ 37	-	145 $\pm$ 28, 5
Aniline	92 $\pm$ 13	95 $\pm$ 30, 9	113 $\pm$ 14	-	130 $\pm$ 15, 3
Triethylamine	-	-	53 $\pm$ 7, 7	-	66 $\pm$ 13, 2

Tableau IX : Variations de la transaminasémie, en unités μ Ez GOT color, chez la souris, sous l'effet de quelques agents hepato-toxiques, en fonction de la dose injectée, par voie sous-cutanée, la durée de l'intoxication étant de quinze heures.

N.B. - Les valeurs témoins déterminées sont de 45 $\pm$ 9 unités μ Ez GOT color.

Agent toxique	Numéros des animaux										M	σ	E
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Tetrachlorure de carbone	620	650	620	550	570	520	570	530	740	-	602	67	23
Paraaminophenol	125	125	120	180	125	135	135	140	135	-	135	18	6
Bromobenzène	105	110	70	180	130	160	160	110	-	-	128	37	12,7
Aniline	100	140	110	120	100	105	130	105	105	-	113	14	4,7
Xylidine	105	110	105	110	105	105	115	90	110	-	108	8,9	3
Orthoaminophenol	110	87,5	110	80	85	110	87,5	80	87,5	-	93	12,4	4,1
Paraaminophenol acétylé	105	90	80	90	95	80	80	90	90	-	88	8,3	2,8
Naphtol	120	55	105	80	60	80	65	80	80	-	80	20,8	7
Acetanilide	45	90	95	60	87,5	110	65	72,5	62,5	80	77	19,5	6
Ortho-cresol	87,5	45	60	105	45	65	125	87,5	65	-	76	28	9,3
Naphtylamine	70	50	80	35	35	40	55	55	55	-	53	15,3	5,1
Triéthylamine	40	55	60	60	45	42,5	55	55	60	60	53	7,7	2,4
Phénylhydrazine	50	46	50	54	44	50	54	52	56	-	51	4	1,33
Nitrite de sodium	70	75	40	40	40	55	40	55	40	45-70	50	14,2	4,3
Chlorate de potasse	60	60	40	35	40	60	35	40	40	-	45	11	3,7
Phentidine	60	40	40	60	35	40	35	40	40	60	45	10,6	3,3
Nitrobenzène	60	45	40	20	47,5	20	60	45	45	-	45	14,4	4,8
Thymol	56	45	34	49	34	53	53	40	34	-	45	9	3
Isoniazide	44	46	42	42	48	50	42	48	48	-	45	3,2	1,1
Témoin	45	56	34	53	34	49	53	34	40	-	45	9	3

Tableau X : Action de quelques agents méthémoglobinisants, sur les transaminasémies, chez la souris, après une durée d'intoxication de quinze heures et à la dose de 100 mg/Kg s.c.

N.B. - M = moyenne des résultats

σ = écart-type

E = erreur-type.

N° d'ordre	Agent toxique	Transaminases		
		en unités	Ez GOT color	
		M	+	-
1	Tetrachlorure de carbone	602	+	67
2	Paraaminophenol	135	+	18
3	Bromobenzène	128	+	37
4	Aniline	113	+	14
5	Xylidine	108	+	8,9
6	Orthoaminophenol	93	+	12,4
7	Paraaminophenol acétylé	88	+	8,3
8	β Naphtol	80	±	20,8
9	Acetanilide	77	+	19,5
10	Ortho - Cresol	76	+	28
11	Naphthylamine	53	+	15,3
12	Triéthylamine	53	+	7,7
13	Phénylhydrazine	51	+	4
14	Nitrite de sodium	50	+	14,2
15	Chlorate de potasse	45	+	11
16	Phenetidine	45	+	10,6
17	Nitrobenzène	45	+	14,4
18	Thymol	45	+	9
19	Isoniazide	45	+	3,2
20	Témoin	45	+	9

Tableau XI : Hypertransaminasémies provoquées chez la souris, par divers agents méthémoglobinisants - (dose injectée : 100 mg/Kg s.c. - durée d'intoxication quinze heures).

Taux de Méthémoglobine en
pourcentage de l'hémoglobine totale

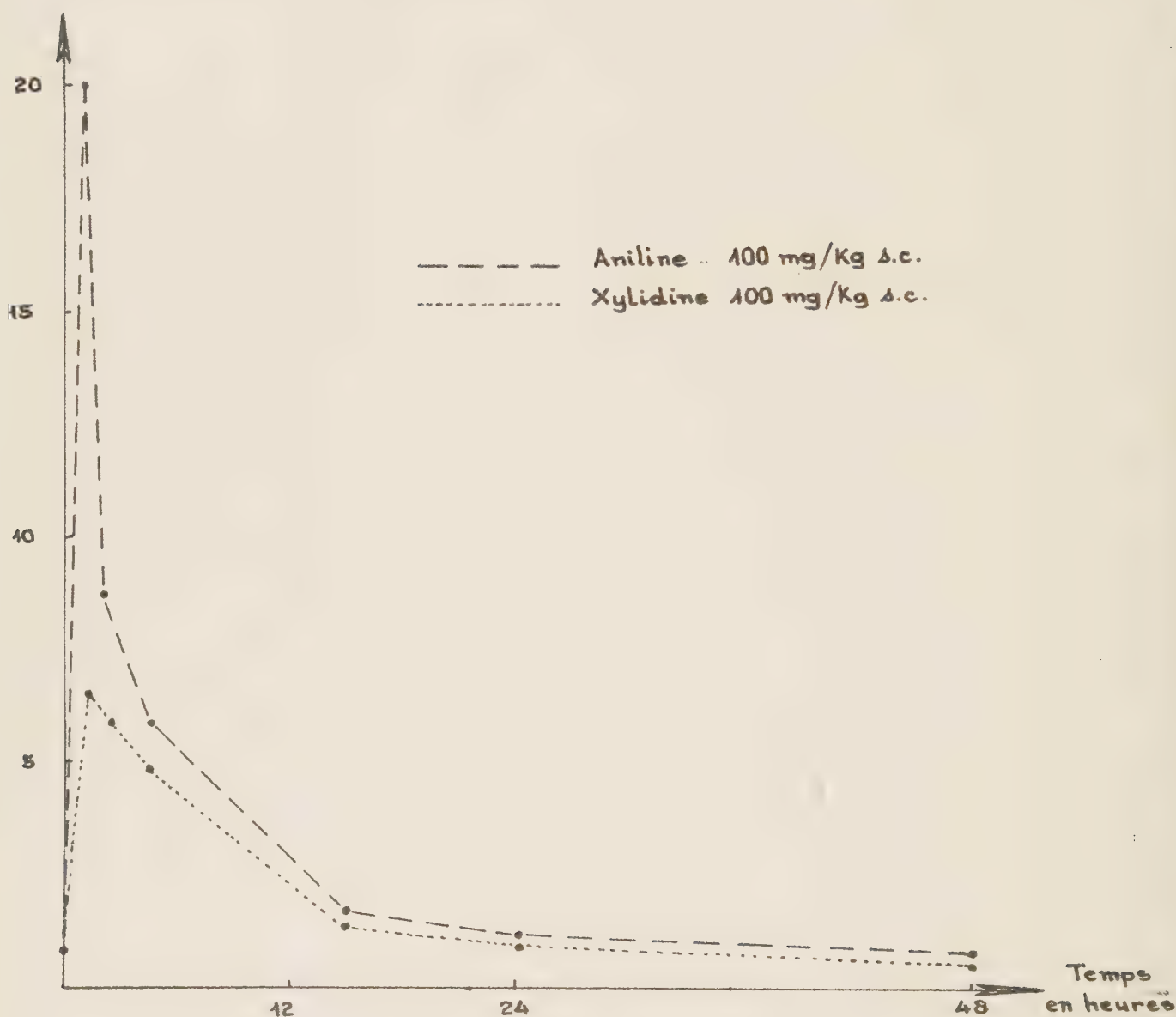


Figure 3 - Méthémoglobinémie provoquée par l'administra-
tion d'aniline et de xylidine, chez la souris.
Variations en fonction du temps.

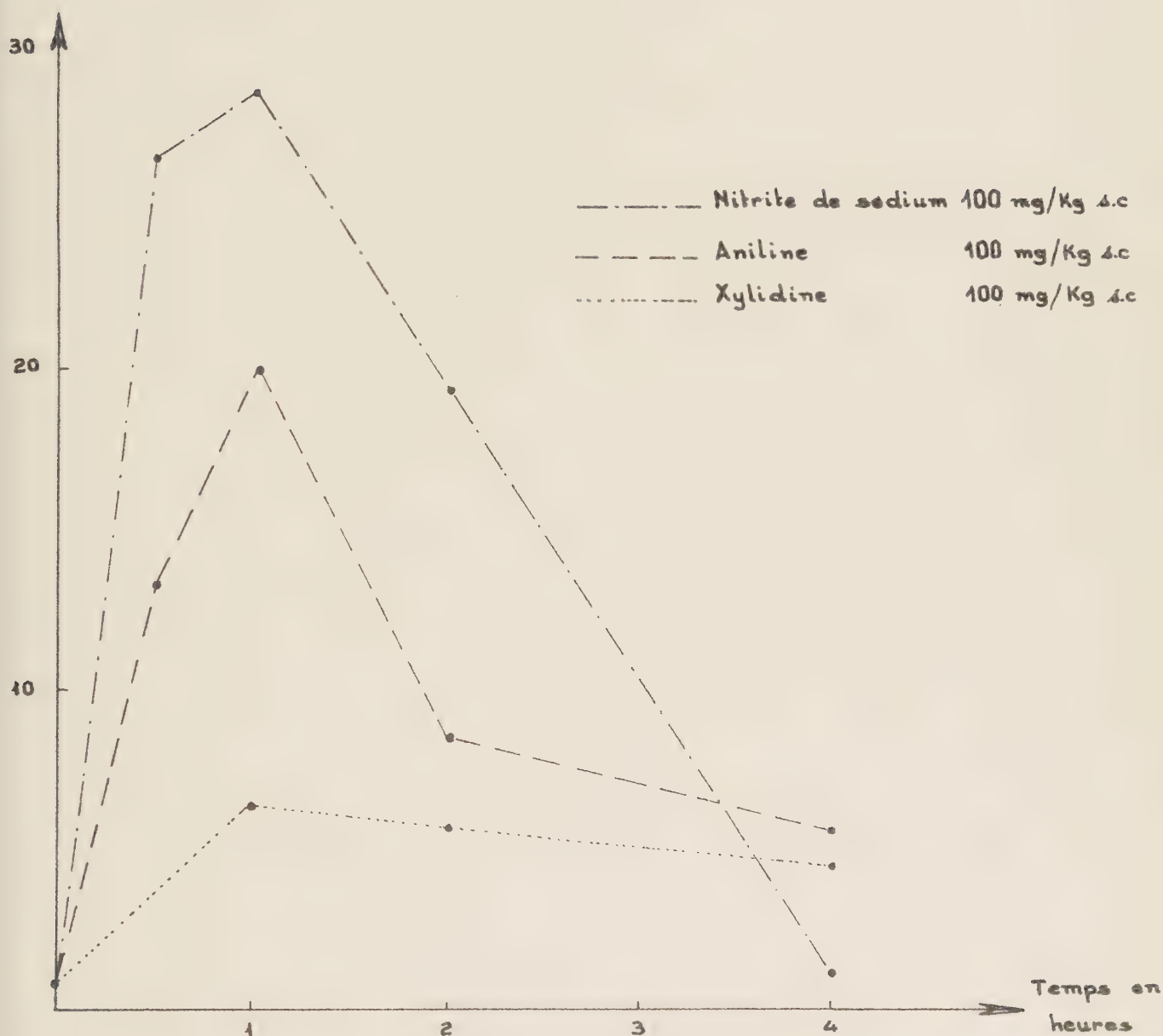


Figure 4 - Activité comparée, de trois agents méthémoglobinisants, chez la souris, en fonction du temps, sur quatre heures.

Taux de Méthémoglobinémie en
pourcentage de l'hémoglobine totale

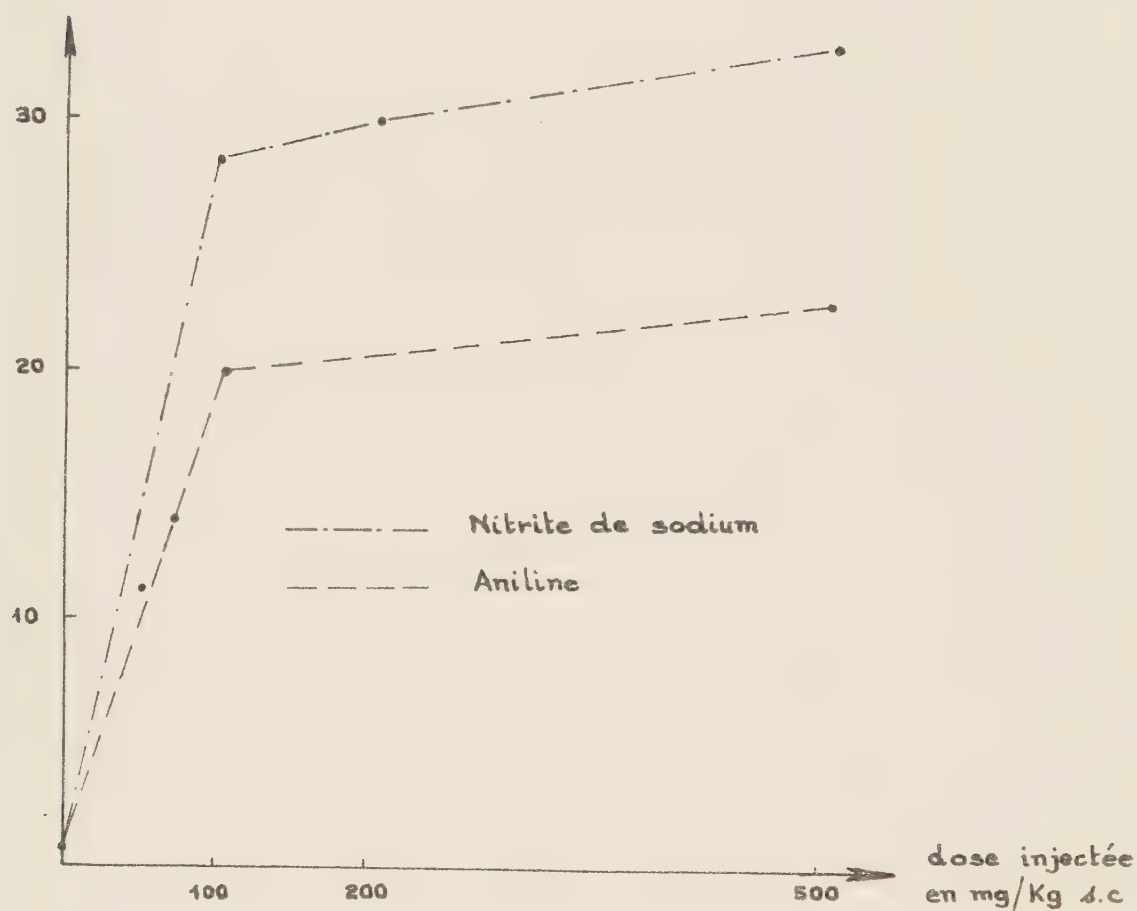


Figure 5 - Variations de la méthémoglobinémie, en fonction de la dose injectée, chez la souris (durée d'intoxication : une heure).

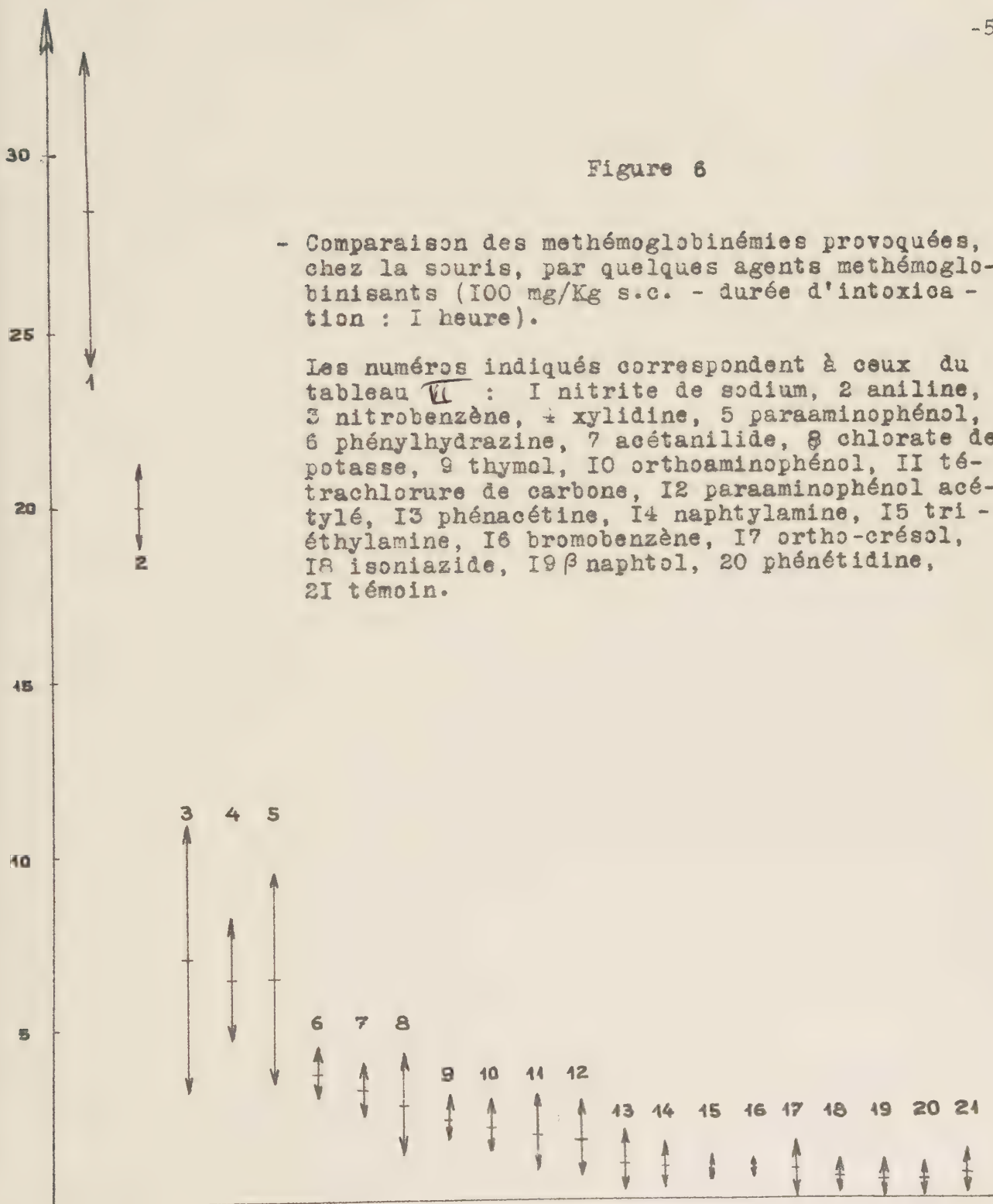
Taux de méthémoglobine en
pourcentage de l'hémoglobine totale

-53-

Figure 6

- Comparaison des méthémoglobinémies provoquées, chez la souris, par quelques agents méthémoglobinisants (100 mg/Kg s.c. - durée d'intoxication : 1 heure).

Les numéros indiqués correspondent à ceux du tableau VI : 1 nitrite de sodium, 2 aniline, 3 nitrobenzène, 4 xylidine, 5 paraaminophénol, 6 phénylhydrazine, 7 acétanilide, 8 chlorate de potasse, 9 thymol, 10 orthoaminophénol, 11 tétrachlorure de carbone, 12 paraaminophénol acétylé, 13 phénacétine, 14 naphtylamine, 15 triéthylamine, 16 bromobenzène, 17 ortho-crésol, 18 isoniazide, 19 β naphtol, 20 phénétidine, 21 témoin.



Transaminasémies en
unités μ Ez GOT color

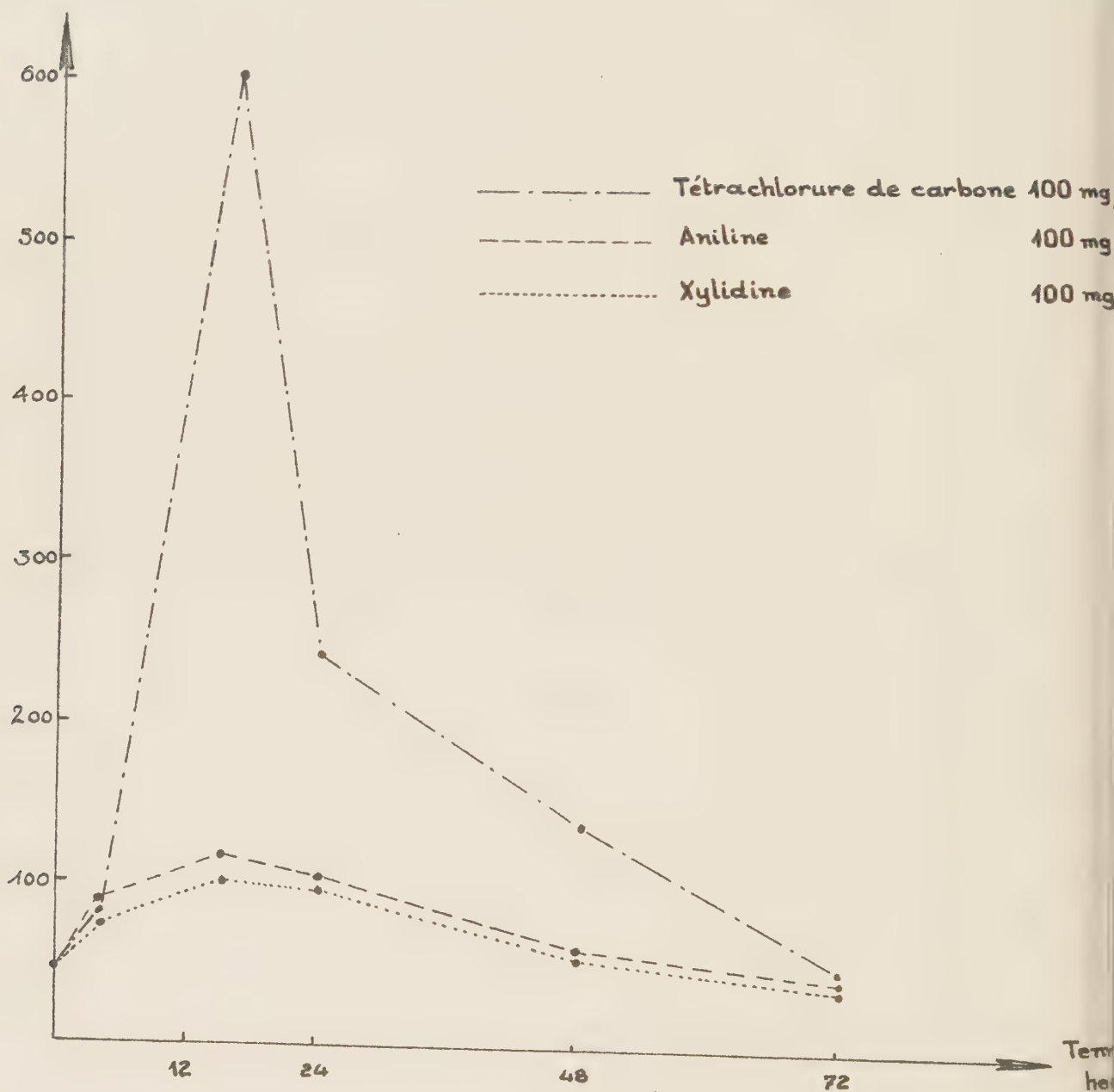


Figure 7 - Variations de la transaminasémie, chez la souris, sous l'effet de quelques agents chimiques, en fonction du temps.

Unités enzymatiques

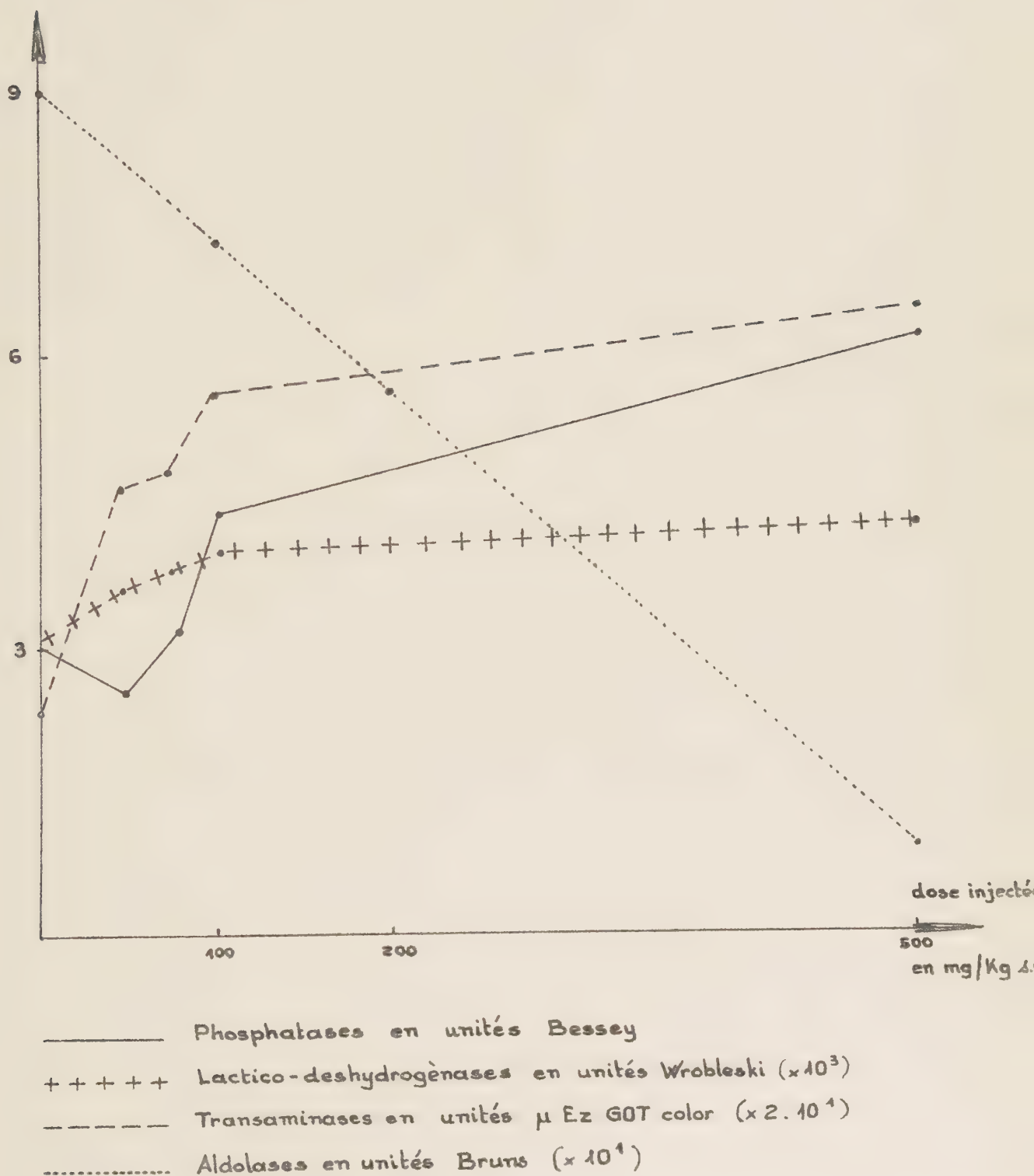


Figure 8 - Variations des taux d'enzymes sériques, chez la souris, sous l'influence de l'aniline, en fonction de, la dose injectée.

Transaminasémie en
unités μ Ez GOT color

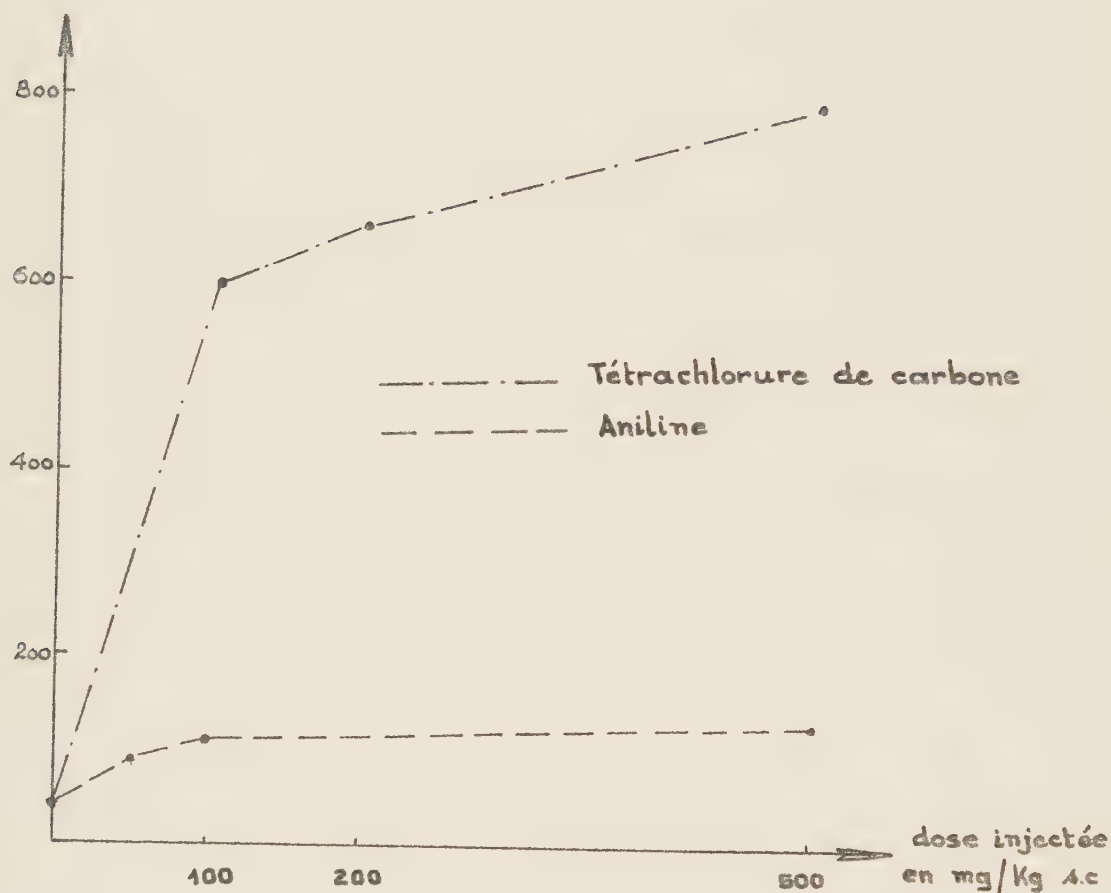


Figure 9 - Transaminasémies provoquées par l'administration de tétrachlorure de carbone et d'aniline, chez la souris.
Variations en fonction de la dose injectée.

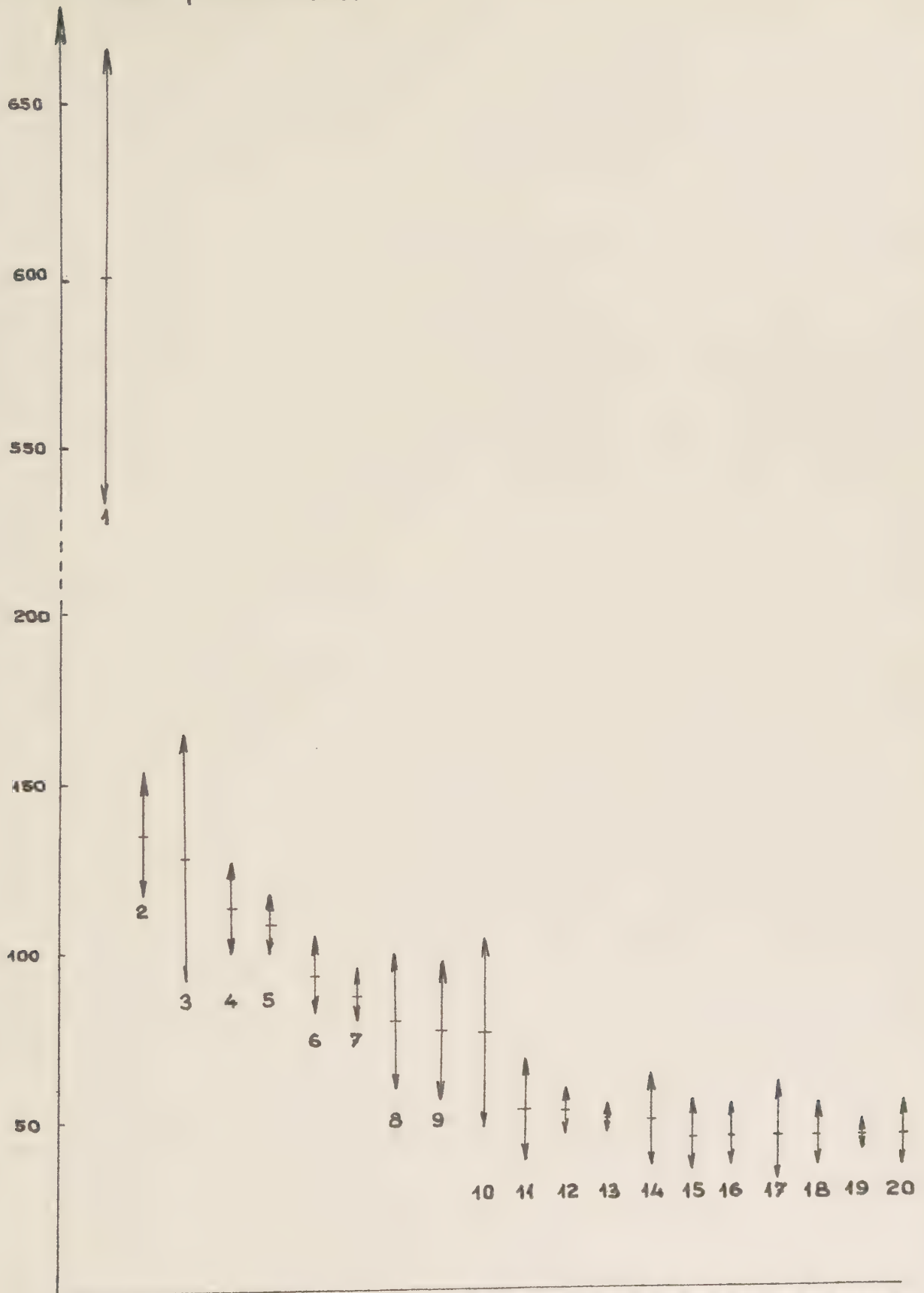


Figure 10 - Hypertransaminasémies provoquées chez la souris, par divers agents méthémoglobinisants (dose injectée : 100 mg/Kg s.c. - durée d'intoxication : 15 heures).
- Les numéros indiqués correspondent à ceux du tableau XI

CHAPITRE II - 4 -

DISCUSSION des RESULTATS - ESSAI D'INTERPRETATION

II - 4 - 1 - Validité des protocoles expérimentaux -

Nous avons exposé plus haut les raisons qui nous ont amenés à choisir le protocole expérimental adopté dans ce travail. Sans doute, la souris est-elle relativement peu sensible aux agents méthémoglobinisants, encore que les méthémoglobinémies observées pour les plus classiques d'entre eux, soient très significatives ; mais chez ce rongeur de très petite taille, les métabolismes sont beaucoup plus rapides que chez la plupart des autres espèces couramment utilisées au laboratoire , ce qui a été particulièrement favorable pour suivre l'évolution des atteintes hématologiques et hépatiques.

Comparer l'action méthémoglobinisante ou hépato-toxique des composés expérimentés, à la dose de 100 mg/Kg, est peut-être plus discutable. Nous avons également envisagé d'autres modes d'expression, en mMoles/Kg et en fonction du rapport de la "dose efficace toxique" à la dose létale 50. Le premier ne modifie pratiquement pas l'ordre des activités méthémoglobinisantes (tableau VI) le second met simplement l'accent sur l'absence de corrélation entre propriétés méthémoglobinisante et toxicité générale aiguë.

Les D. L. 50 de l'aniline, du chlorate de potassium, de la triéthylamine, de la xylydine et du nitrobenzène, sont très voisines (480-600 mg/Kg voie s.c. chez la souris). A la dose de 100 mg/Kg, les méthémoglobinémies observées sont respectivement de 20, 2, 7, 0, 9, 6, 4, 7 % de l'hémoglobine totale ; la phenylhydrazine (D. L. 50 170 mg/Kg voie s.c. chez la souris) n'a provoqué, dans les mêmes conditions, c'est-à-dire à une dose supérieure à la moitié de la D. L. 50, qu'une méthémoglobinémie maximale de 3,7 %. Dans ce sens, nos résultats sont absolument conformes aux données de la littérature.

La même discordance a été observée au laboratoire, au cours d'une étude comparée des effets de quelques agents hépato-toxiques, sur l'épuration sanguine de la bromosulfonephtaléine (24).

Nous avons vu, par ailleurs, qu'il y a une certaine proportionnalité entre les méthémoglobinémies maximales observées et les doses administrées, lorsque celle-ci sont comprises entre 20 et 100 mg/Kg. Il n'en est plus de même au-delà les courbes de méthémoglobinémies présentant presque un plateau (figure 5). *

II - 4 - 2 - Activité méthémoglobinisante ou hépato-toxique et structure chimique -

Les résultats que nous avons rapportés ne permettent pas de relier les deux processus toxiques observés. Le nitrite de sodium, le plus méthémoglobinisant des composés étudiés, n'a pratiquement aucune hépato-toxicité dans nos conditions expérimentales ; le tetrachlorure de carbone et le bromobenzène, deux composés classiquement utilisés pour créer une hépatite toxique aiguë chez l'animal, n'exercent aucune action méthémoglobinisante.

Des produits expérimentés, seuls l'aniline, certaines amines aromatiques homologues et leurs dérivés, sont méthémoglobinisants et provoquent aussi une atteinte hépatique objectivée par les hyperenzymémies observées.

Des structures particulières ou des groupements fonctionnels semblent donc orienter la toxicité de la molécule.

Dans les composés organiques, la présence d'un groupement aminé primaire juxtanucléaire, est considéré souvent, à priori, comme responsable de l'activité méthémoglobinisante de la molécule. Les résultats obtenus avec l'aniline et la xylidine sont en accord avec cette notion. Le groupement aminé n'est pas seul en cause : la triéthylamine n'est pas méthémoglobinisante, dans nos conditions expérimentales ; mais il en est de même de la phenetidine et de la naphtylamine, bien qu'il s'agisse aussi d'amines primaires juxtanucléaires.

*

Dans le cas de l'aniline, cette observation est également valable pour l'augmentation des transaminasémies et des taux de la α - deshydrogenases (figure 8).

Peut-on en déduire que l'activité méthémoglobinisante in vivo de ces dérivés est liée à la formation éventuelle d'un métabolite actif ? . Une telle hypothèse permettrait peut-être d'expliquer, à la fois, la discordance de nos résultats et les différences de sensibilité observées d'une espèce à l'autre.

D'après WILLIAMS (98), l'aniline est essentiellement éliminée dans l'urine sous la forme de paraaminophénol et d'orthoaminophénol. Ces composés sont partiellement acétylés sur l'azote aminé et sous la forme d'esters phénoliques (glycurono et sulfoconjugués). Les proportions relatives de ces divers métabolites varient en fonction de l'espèce.

Nous avons pu déterminer l'activité méthémoglobinisante, chez la souris, de trois d'entre eux : le p. aminophénol, l'O. aminophénol et le p. aminophénol acétylé. Confirmant des travaux antérieurs (56), les résultats obtenus ne permettent pas de rapporter à leur formation in vivo, le pouvoir méthémoglobinisant de l'aniline. Dans le cas des anilides, il a, du reste, été démontré (20) que ce dernier était fonction des possibilités de désacylation in vivo et dépendait, par suite, de la nature de l'agent acylant.

Ainsi, la question demeure entière et il semble difficile d'expliquer, à l'heure actuelle, la différence observée dans le pouvoir méthémoglobinisant des amines aromatiques. *

Les dérivés chlorés tels que le tétrachlorure de carbone et le bromobenzène sont connus pour leur hépato-toxicité.

Nous avons aussi constaté une hyperenzyménie significative d'une atteinte hépatique, après administration de phénols tels que l'o-crésol ; le β naphthol et les aminophénols (o- et p.) libres ou acétylés. Ces derniers conservent une toxicité hépatique comparable à celle de l'aniline, alors que leur activité méthémoglobinisante est fortement réduite (tableau XII).

	Méthémoglobine en % hémoglobine totale	Transaminasémies en unités μ Ez G. OT. color.
Aniline	20	113
P. aminophénol	6,4	135
O. aminophénol	2,3	93
P. aminophénol acétylé	1,8	88

Tableau XII - Comparaison des effets méthémoglobinisants et hépato-toxiques de l'aniline et de ses dérivés.

* Il y aurait lieu peut-être de comparer in vitro et in vivo, la répartition de ces dérivés dans les différents compartiments liquidiens de l'organisme et notamment d'étudier leur vitesse de passage à travers la membrane plasmique.

Par contre, l'éthérification de la fonction phénolique conduit à des composés beaucoup moins toxiques sur les deux plans ; l'administration de phénétidine (p. ethoxyphenylamine ou p. ethoxyaniline), ne s'accompagne ni d'une méthémoglobinémie ni d'une augmentation des taux sériques de transaminases.

Les atteintes hépatiques éventuellement provoquées par les produits expérimentés ont été suivies systématiquement par les variations des taux de transaminases sériques consécutives à leur administration.

Nous avons cependant étudié l'hépto-toxicité de l'aniline et de la xyldine, en dosant, au cours de l'essai, les transaminases, la lactico-deshydrogenase, les phosphatases alcalines et les aldolases. Si notre choix s'est porté ultérieurement sur les transaminases S.G.O.T., c'est qu'il nous a paru, dans nos conditions expérimentales, que les taux de cette enzyme étaient les plus augmentés (de 45 à 130, dans le cas de l'aniline). Les variations de la lactico-deshydrogenase sont parallèles à celles des transaminases (de 3.000 à 5.200) ; les phosphatases alcalines augmentent peu, mais régulièrement (de 3 à 6,2). Par contre, les aldolasémies subissent, au cours de l'intoxication à l'aniline, une baisse très sensible proportionnelle à la dose administrée (de 87 à 10). *

Une telle différence dans l'évolution des taux sériques d'enzymes d'origine hépatique est apparemment paradoxale et nous a amenés à étudier in vitro, l'action de la xyldine (100 mg/par litre, 15 heures de contact), sur l'activité enzymatique d'un même échantillon de sérum. Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau XIII suivant :

Enzymes	Sérum témoin	Sérum traité à la Xylidine 1 x 10 ⁻⁴ après 15h. de contact	Variations trouvées
Transaminases	; 44	37,5	- 15 %
L.D.H	3.200	3.000	- 7 %
Phosphatases alcalines	2,9	1,85	- 36 %
Aldolases	91	73	- 17 %

Tableau XIII - Etude in vitro de l'action de la xyldine sur l'activité enzymatique du sérum.

Contrairement à ce qu'on pourrait en attendre, la présence de xylydine n'inhibe pas spécifiquement l'aldolase mais, de façon d'ailleurs limitée, tous les enzymes étudiés, l'activité phosphatasique étant atteinte préférentiellement. Une telle étude mériterait d'être reprise avec les métabolites éventuels de cette amine aromatique, pour tenter d'expliquer l'anomalie observée in vivo dans les variations des enzymémies ; il semble, en effet, difficile de concevoir, au niveau cellulaire, un mécanisme responsable, à la fois, d'une hyper et d'une hypoenzymémie.

Quoi qu'il en soit, qu'il s'agisse de toxicité associée ou non, les deux processus ne sont jamais concomittants.

Les méthémoglobinémies ont toujours été observées de façon très précoce et atteignent leurs valeurs maximales dans l'heure qui suit l'administration du produit.

Les hyperenzymémies, reflet éventuel de l'atteinte hépatique, évoluent beaucoup plus lentement : dans le cas notamment de l'aniline et de la xylydine, les taux d'enzymes sériques sont encore très proches de la normale à la quatrième heure (figure 7), c'est-à-dire au moment où les méthémoglobinémies ne représentent plus que 5 à 10 % de leurs taux les plus élevés, et il faut attendre chez la souris, la quinzième heure de l'essai pour obtenir les hyperenzymémies maximales, les taux de méthémoglobine étant alors, depuis plusieurs heures, très proches de la normale.

Il apparait ainsi que le dosage de la méthémoglobine n'est valable que dans les premières heures qui suivent une intoxication par l'aniline, la xylydine et leurs dérivés.

Cette recherche pourra même être négative si les prélèvements sont effectués tardivement, alors que des tests enzymatiques perturbés témoignent encore des effets hépato-toxiques de ces composés.

CONCLUSIONS

Nous avons comparé chez la souris, l'activité méthémoglobinisante de quelques agents chimiques et étudié leurs effets hépato-toxiques éventuels.

A la lumière de nos résultats, il semble difficile de relier les deux phénomènes : dans les conditions expérimentales adoptées, le nitrite de sodium, le plus actif parmi les composés méthémoglobinisants étudiés, ne paraît responsable d'aucune atteinte hépatique ; le tétrachlorure de carbone, caractérisé par une hépato-toxicité spécifique, n'est pas méthémoglobinisant chez la souris.

De tous les produits soumis aux essais, seuls, l'aniline, certains de ses dérivés et des amines aromatiques homologues, notamment la xylydine, sont méthémoglobinisants et exercent aussi au niveau de l'hépatocyte une action toxique objectivée par une élévation significative des taux de transaminases et de lactico-deshydrogénase sériques.

Les deux processus ne sont cependant pas concomitants : très précoces, les méthémoglobinémies sont maximales chez la souris une heure environ après l'injection toxique alors que les tests enzymatiques choisis ne témoignent d'un dysfonctionnement hépatique qu'après plusieurs heures de latence, les hyperenzymémies maximales étant observées en général vers la quinzième heure de l'essai.

Ainsi, mieux qu'une méthémoglobinémie généralement fugace, l'élévation des taux de transaminases du sérum peut, en dépit d'une spécificité relative, être considérée comme un test valable d'une intoxication par l'aniline et les composés apparentés.

Le Président de la Thèse :

Professeur A. CIER

Vu, le Doyen :

J.F. CIER

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 27 Novembre 1964
Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université

P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AKAHORI (W.) - Poisoning by amino and nitro compounds, Folia. Pharmacol. Japon, 1954, 50, 105 et 422. (Chem. Abst., 49, 11.878 g et 50, 10.517 f).
- 2 - BAIER (H.), HENNEMANN (G.), MUHLER (F.) - Evaluation of the activity of chronic liver diseases by détermination of serum enzymes, Klin. Wochschr., 1961, 39, 117. (Chem. Abst., 55, 12.603 h).
- 3 - BERITIC (T.), VALIC (F.) - Toxic méthémoglobinemia caused by nitrites, Archiv. Hig. Rada., 1955, 6, 303. (Chem. Abst., 50, 17.181 e).
- 4 - BESSEY (O.A.), LOWRY (O.H.), BROCK (M. J.) - Method for the determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum, J. Biol. Chem., 1946, 164, 321.
- 5 - BLANC (P.) - Le nitrite de sodium, Imprimerie Régionale Toulouse, 1946 p. 35 et 78.
- 6 - BRAUNER (R.), SORU (E.), MINCU (I.), NEGOESGU (V.), HOANCA (O.), BAZELAN (A.) - Enzymological investigation of chronic hepatitis and hepatic cirrhosis, Mad. Interna., 1960, 12, 1629. (Chem. Abst., 55, 7.618 g).
- 7 - BRODIE (B.B.), AXELROD (J.) - The fate of acetanilid in man, J. Pharm. and Exptl. Ther., 1948, 94, 29.
- 8 - BROWN (M.W.) - Effect of aniline in rabbits, J. Infect. Dis., 1917, 21, 497.
- 9 - BRUNS (F.) - Determination and properties of serum aldolase, Biochem. Z., 1954, 325, 156.
- 10 - BRUNS (F.), JACOB (W.) - Serum enzymes in liver diseases. Activity of phosphohexose-isomerase, aldolase and alkaline phosphatase, Klin. Wochschr., 1954, 32, 1.041. (Chem. Abst., 50, 1933 b).
- 11 - BRUNS (F.), NEWHANS (J.) - The activity of some serum and liver enzymes in the experimental carbon tetrachloride injury in mouse, Biochem. Z., 1955, 326, 242.
- 12 - BRUNS (F.), NEWHANS (J.) - Glycolytic serum and liver enzyme activities in experimental liver damage, Arch. Biochem. and Biophys., 1955, 55, 588.

- 13 - BUGIARDINI (G.), VALLINI (A.) - Determination of transaminase and aldose in the serum of patients with various liver diseases, *Arcisped. S. Anna Ferrara*, 1958, 11, 1.081. (Chem. Abst., 54, 6.940 h).
- 14 - BURLINA (A.), LIPPI (U.) - Histopathological basis of serum transaminase alterations in experimental liver diseases, *Riv. anat. pat. c. oncol.*, 1957, 12, 232. (Chem. Abst., 51, 18.276 c).
- 15 - BYRON (B.), CLARK (J.), VAN LOON (E. J.), MORISSEY (R. W.) - Acute experimental aniline intoxication, *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, 1943, 25, 1.
- 16 - CAIRELLA (M.), LEOFREDDI (L.) - Behavior of blood iron in liver disease, *Hepathologia*, 1961, 7, 108.
- 17 - CAJAL (N.), BABA (C.), TUCHOR (V.), LITMAN (S.), BOERN (V.)
- Clinical inapparent forms of infectious hepatitis detected by the serum aldolase test, *Comun. Acad. rep. popolare. romine*, 1958, 8, 967. (Chem. Abst., 55, 23.761 g).
- 18 - CERABONA (M.) -Hyperglycemia and ketonemia in poisoning by pure aniline, *Folia. Med.*, 1943, 29, 333 (Chem. Abst., 38, 6.378-8).
- 19 - CHIAPPE (F.), SILVETTI (M.) - Some aspects of glutamic oxalacetic and glutamic - pyruvic transaminase and serum aldolase during acute liver disease, *Ann. Ital. Pediat.*, 1961, 14, 54 (Chem. Abst., 56, 4.013 b).
- 20 - CIER (A.) - Contribution à l'étude des anilides et aniles citriques et aconitiques, *Thèse Etat Pharmacie. Lyon*, 1954.
- 21 - CIER (A.), ROUX (F.), NOFRE (C.) - Etude du métabolisme et de l'élimination de l'ion nitrique chez l'homme, *Bull. Trav. Soc. Pharmacie Lyon*, 1960, 4, 115.
- 22 - COLE (L. J.), BOND (W. P.), FISCHLER (M. C.) - Preprotection of mice against X-irradiation mortality by $\text{NO}_2 \text{ Na}$, *Science*, 1952, 115, 644.
- 23 - COLE (L. J.), ELLIS (M. E.) - Additivity of radiation protection by cysteine and sodium nitrite in mice, *Am. J. Physiol.*, 1953, 175, 429.
- 24 - COQUET (B.), CIER (A.), FRANDON (A.) - Epuration sanguine de la B. S.P. chez la souris dans les hépatites expérimentales , *Compt. rend. soc. biol*, 1964, sous presse.
- 25 - CORSI (A) - Alkaline phosphatases in the corrhosis caused by carbon tetrachloride in the rat, *Arch. sci. biol.* 1955, 39, 241.
- 26 - DI LAURO (S.), FATI (S.), VECCIONE (C.) - Serum iron and free protoporphyrin in the erythrocytes in experimental aniline poisoning, *Folia Med.*, 1957, 40, 397.

- 27 - DI STASI (M.), GAVOSTO (F.) - Glumatic oxalacetic and glumatic pyruvic transaminases in blood serum in liver disease, *Minerva gastroenterol.*, 1958, 4, 196. (Chem. Abst., 53, 10.500 a).
- 28 - DUTKIEWICZ (T.) - Absorption and metabolism of aniline in man, *Lodz. Towarz. Nauk. Wydzial III*, 1962, 75, 83. (Chem. Abst., 58, 7.287 a).
- 29 - ELLINGER (P.) - The mechanism of the formation of methemoglobin through acetanilide and its derivatives, *Z. physiol. chem.*, 1920, 111, 86.
- 30 - EVELYN (K.A.), MALLOY (H.T.) - Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin, and sulfhemoglobin in a single sample of blood, *J. Biol. Chem.*, 1938, 126, 655.
- 31 - FRANKL (H.D.), GAERTNER (P.L.), KOSSUTH (L.C.), MILCH (L.J.) - Toxic vapor inhalation and serum enzymes levels, *Texas. Repts. Biol. and Med.*, 1957, 15, 868.
- 32 - FRIEDEL (H.), SCHILOWA (A.) LUDWINOWSKY (R.) - Heinz bodies and methemoglobin formation in poisoning by compounds containing amino and nitro groups, *Folia. Haematol.*, 1937, 56, 333.
- 33 - GHIRINGHELLI (L.) - The relation between methemoglobinemia and catalase in experimental intoxication by aniline, *Med. Lavoro*, 1952, 43, 272. (Chem. Abst., 47, 2.283 f).
- 34 - GHIRINGHELLI (L.), MOLINA (C.) - Methemoglobin in acute poisoning in experimental animals and in man. Its relation with cyanosis, anemia and Heinz bodies, *Med. Lavoro*, 1951, 42, 125. (Chem. Abst., 46, 2.185 i).
- 35 - GLEY (P.) - The action of aniline derivatives on the blood, *Bull. acad. Med.*, 1937, 118, 377.
- 36 - GOLDSTEIN (I.), POPOVICI (C.) - Modification of blood pigment in acute experimental nitrobenzene intoxication, *Igiena*, 1957, 6, 10. (Chem. Abst., 53, 13.399 b).
- 37 - GRATZER (W.B.), ALLISON (A.C.) - Multiple hemoglobins, *Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc.*, 1960, 35, 459.
- 38 - GRAY (J.L), TEW (J.T.), JENSEN (H.) - Protective effect of serotonin and of P. aminopropiophenone against lethal doses of X - irradiation, *Proc. Exp. Soc. Biol. Med.*, 1952, 80, 604.
- 39 - GREENBERG (L.A.), LESTER (D.) - Metabolic fate of acetanilid and other aniline derivatives : III Role of paraaminophenol in production of methemoglobinemia after acetanilid, *J. Pharmacol.*, 1947, 90, 150.
- 40 - HARLEY (J.D.) ROBIN (H.) - The effect of the nitrite ion on intact human erythrocytes, *Blood*, 1962, 20, 710.

- 41 - HASHIMOTO (T.) - Changes of methemoglobin with daily administration of aniline and nitrobenzène, Kokumin Eisei, 1958, 27, 239. (Chem. Abst., 55, 2.932 f).
- 42 - HEMMELER (G.) - Métabolisme du fer, 1951, p. 11.
- 43 - HEUBNER (W.) , STUHLMANN (M.) - Formation of methemoglobin : XXI Reaction in drawn blood, Arch. exptl. Path. Pharmacol., 1942, 199, 1.
- 44 - HORN (M.D.), AMELUNG (D.) - Serum transaminases and lactic deshydrogenase in the liver disease, Deut. Med. Wochschr., 1957, 82, 619. (Chem. Abst., 51, 15.754 e).
- 45 - HRUZIK (H.), LANGER (J.) - Changes of transaminase activity in the serum an liver of rabbits in toxic injury of the liver produced by carbon tetrachloride, Bratislava Lekarski Listy , 1960, 40, 11, 548. (Chem. Abst., 55, 5.781 g).
- 46 - HUG (E.) - Influence du nitrite de sodium et du bleu de méthylène sur la formation de méthémoglobine in vivo, Compt. rendu soc. biol. 1933, 114, 947.
- 47 - JENSEN (C.W.), ANDERSON (H.D.) - Rate of formation and disappearance of methemoglobin following oral administration or injection of sodium nitrite, Proc. S. Dakota. Acad. Sci ., 1941, 21, 37.
- 48 - JUNG (F.) - Chlorate poisoning, Klin-Wochschr., 1943, 22, 43. (Chem. Abst., 38, 4.313-8).
- 49 - JUNG (F.) - Studien über Methämoglobindildung, Arch. Exptl. Path. Pharmacol, 1940, 195, 208.
- 50 - JUNG (F.), RUMMER (H.) - Reactions between nitrite and hemoglobin, Arch. Exptl. Path. Pharmacol, 1949, 206, 459.
- 51 - KALLAI (L.), HAHN (A.), ROEDER (V.), ZUPANIC (V.) - Correlation between histological finding and serum transaminases values in chronic diseases of the liver, Acta. Med. Scand., 1964, 175, 49.
- 52 - KILGORE (L.), AILON (L.), GIEGER (M.) - Effects of dietary nitrate on rabbits and rats, J. Nutrition, 1959, 69, 39.
- 53 - KRUSE (T.K.), MAC ELIROY (W.S.), GUTHRIE (C.C) - Methemoglobine-mia, J. Pharmacol. Proc., 1927, 31, 208.
- 54 - LAPIS (J.), MANDAT (A.), SZYMANSKA (H.) - Activity of certain serum enzymes in liver cirrhosis, Polskie. Arch. Med. Wewnetrznej, 1962, 32, 193. (Chem. Abst., 61, 1.092 f).
- 55 - LEGGE (J.W.) - Methemoglobin formation, J. Proc. Roy. Soc. N.S Wales, 1942, 76, 47.

- 56 - LESTER (J.W.) - Formation of methemoglobin, species differences with acetanilid and acetophenetidine, J. Of. Pharm. and Exptl. Therap., 1943, 77, 154.
- 57 - LITTARDI (A.), ZANICHELLI (A.) - Methemoglobizing action of sodium chlorate, Bull. Soc. ital. biol. sper., 1939, 14, 182. (Chem. Abst., 33, 6.957-7).
- 58 - LUCE (R.V.), HAMILTON (A.) - Industrial poisoning in the U.S., J. Am. Med. Assoc., 1916, 66, 1.441.
- 59 - LUNDBERG (A.) - Acute methemoglobinemia caused by aniline dye intoxication, Report of a case, Acta Paediat., 1954, 43, 83 (Chem. Abst., 49, 15.043 e).
- 60 - MAGOS (L.), SZIZA (M.) - Formation of Heinz bodies and change in hemoglobin, Acta Haematol, 1959, 22, 51.
- 61 - MARSHALL (W.) MARSHALL (C.R.) - The action of nitrites on blood, J. Biol. Chem., 1945, 158, 187.
- 62 - NAGY (T.V.) - Poisoning by chlorite and chlorate, Orvosok lapja Nepegeszsegügy, 1947, 3, 1.665. (Chem. Abst., 53, 1.441 b).
- 63 - NAKAJIMA (T.) - Methemoglobin formation by aromatic nitro and amino derivatives : II quinone body formation in vivo, Rôdô Kagaku Kiho, 1955, 4, 7. (Chem. Abst., 42, 8.953 e).
- 64 - NAKAJIMA (T.), KUSUMOTO (S.) - Methemoglobin formation by aromatic nitro and amino compounds : methemoglobin formation by aminophenol and diphenol in vitro, Ind. Health., 1963, 1, 12.
- 65 - NEWTON (C.R.) AKRON (J.) OHIO (C.) - Industrial blood poisons, J. Am. Med. Assoc., 1920, 74, 1.149.
- 66 - NICLOUX (M.) ROCHE (S.) - Etude de la réaction du ferricyanure de potassium avec l'hémoglobine, l'oxyhémoglobine, et la carbohémoglobine, et de la teneur en oxygène de l'hémoglobine, Compt. rend. soc. biol., 1925, 93, 1.373.
- 67 - ORGERON (J.D.), MARTIN (J.D.), CARAWAY (C.T.) MARTINE (R.M.), HANSER (G.H.) - Methemoglobinemia from eating meat with high nitrite content, Publics Health. Repts., 1957, 72, 189.
- 68 - PAYSANT (P.), CHANTECLERC (G.), LASCOMBES (G.) CASSE (D.), DUE (M.) - Importance de la transaminase sérique dans l'atteinte hépatique, Revue Médicale de Nancy, 1960, 85, 1.005.
- 69 - PETERSEN (C.) - Formation of methemoglobin : XX O. aminophénol and nitrobenzène, Arch. Exptl. Path. Pharmacol., 1941, 198, 675.
- 70 - PIETSHMANN (H.) - Comparative activity determinations of serum enzymes in liver diseases (glumatic oxalacetic transaminase, lactat-deshydrogenase, aldolase, alkaline phosphatase), Weiner.Z. Inn. Med., 1960, 41, 166. (Chem. Abst., 56, 7.900 i).

- 71 - PLETSCHER (A.), THOELEN (H.), RICHTERICH (R.), - Experimental study of the action of aromatic amines, *Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta*, 1953, 11, 171. (Chem. Abst., 47, 11.517 i).
- 72 ~~P~~OLONOWSKI (M.), BOULANGER (P.), MACHEBOEUF (M.), ROCHE (J.), - Schéma des relations entre l'hémoglobine, l'oxyhémoglobine, la carboxyhémoglobine et la methemoglobine, *Biochimie Médicale*, 1952, 1, 169.
- 73 - PRICE - JONES (C.), BOYCOTT (A.E.) - Changes in the blood and bone marrow produced by experimental aniline poisoning, *Guys. Hosp. Reports*, 1909, 63, 303.
- 74 - RABBENO (K.), RAPPEPORT-LEWEY (S.), - Methemoglobinizing effect of sodium nitrite in vivo, *Boll. soc. ital. biol. sper.*, 1936, 11, 34 (Chem. Abst., 30, 4.927-1).
- 75 - RABE (F.) - Action of aromatic nitro compounds upon the coloring matter of the blood, *Arch. Exptl. Path. Pharm.*, 1919, 85, 91.
- 76 - RAPPEPORT-LEWEY (S.) - Methemoglobinizing action of sodium nitrite, *Arch. farmacol. sper.*, 1936, 62, 17. (Chem. Abst., 31, 460-2).
- 77 - REITMAN (S.), FRANKEL (S.) - A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.*, 1957, 28, 56.
- 78 - RICHTERICH (R.) - Dysfonctions enzymatiques du foie, *Med. et Hyg.*, 1961, 19, 677.
- 79 - ROUX (F.) - Contribution à l'étude du métabolisme et de l'élimination de l'ion nitrate chez l'homme, *Thèse Pharmacie Lyon* 1961.
- 80 - SALONNA (L.), TRIGGIANI (G.), BASSI (R.), CALPISTA (F.) - Behavior of some enzymes patients affected with various liver diseases comparative study, *Prog. Med.*, 1961, 17, 323.
- 81 - SCHEFF (G.J.) - Influence of partial and complete hepatectomy on methemoglobin formation by aniline and p-aminophenol, *J. Pharmacol.*, 1940, 70, 334.
- 82 - SCHMIDT (E.), SCHMIDT (F.W.), - Enzyme determination in the serum in the diagnosis of liver disease, *Hippokrates*, 1961, 31, n° 18, 1. (Chem. Abst., 56, 12.194 c).
- 83 - SCHWARZMANN (M.V.) - Variations des transaminases et de l'aldolase sériques dans les atteintes hépatiques, *Arch. maladies appar. digest. et maladies nutrition*, 1957, 46, 11.
- 84 - SCHWEDTKE (C.) - Methemoglobin formation : VIII, Methemoglobin formation by aniline, *Arch. Exptl. Path. Pharmacol.*, 1938, 188, 121.
- 85 - SEEKLES (L.), SJOLLEMA (B.) - The composition of the blood in potassium nitrite poisoning. Methemoglobin in animal bodies, *Acta brevia Neerlandica, Physiol. Pharmacol. Microbiol.* 1932, 2, 226. (Chem. Abst., 26, 3.842-5).

- 86 - SHIRAI (T.) - Lactic deshydrogenase activity in liver damage Osaka, Daigaku, Igaku, Zasshi, 1959, 11, 2.965. (Chem. Abst., 54, 743 a).
- 87 - SIBLEY (J.A.), HIGGINS (G.M), FLEISHER (G.A.) - Serum aldolase in experimental liver necrosis, Arch. Pathol., 1955, 59, 512.
- 88 - SLATER (E.C.) - Spectrophotometric determination of fructose 1-6 diphosphate, hexose monophosphates, adenosine triphosphate and adenosine diphosphate, Biochem. J., 1953, 53, 157.
- 89 - STEFEL (R.E.) - Methemoglobinemia due to poisoning by a shoe dye, J. Am. Med. Assoc., 1919, 72, 395.
- 90 - STORET (J.B.), COON (J.) - Protective effect of P.aminopropriophenone against lethal doses of X-irradiation, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 74, 202.
- 91 - SZIGETTI - Vjschr. Gerichtl. Med. 1893, 3, 9 (suppl). - Cité par LESTER, D., p. 154.
- 92 - TADAYUKI (I.) - Methemoglobinemia of rabbits administred by aniline, Fukuoka, Igaku, Zasshi, 1959, 50, 3.794 (Chem. Abst., 54, 17.725 c).
- 93 - VERGNANO (F.), DI STASI (M.), RECORARI (L.), GAVOSTO (F.) - Lactic deshydrogenase activity of blood serum in various liver diseases, Minerva gastroenterol., 1958, 4, 226. (Chem. Abst., 53, 10.500 b).
- 94 - VESCE (C.A.) - Protrombine time in expérimental aniline poisoning, Folia Med., 1948, 31, 427.
- 95 - VETTER (K.) FALEK (I.) - Clinical studies in liver cirrhosis : enzymes détermination in blood in cirrhosis, Z. Ges. Inn. Med. u. Ihre. Grenzgebiete., 1961, 16, 1.014 (Chem. Abst., 56, 9.327 f).
- 96 - WANG (J.H.) - Hemoglobin and myoglobin, Oxygenases, 1962, 1, 469.
- 97 - WETHERHOLD (J.M.), LINCH (A.L.), CHARSHA (R.C.) - Hemoglobin analysis for aromatic and amino compounds exposure control, Am. Ind. Hyg. J., 1959, 20, 396.
- 98 - WILLIAMS (G.) - The mecanism of drugs and allied organic compounds, Detoxication Meclamisms 1952, p.142.
- 99 - WINTER (A.J.) - Nitrate metabolism in cattle, Am. J. Vet. Res., 1962, 23, 500.
- 100 - WROBLEWSKI (F.), LA DUE (J.S.), - Lactic deshydrogenase activity in blood, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 90, 210.

- 101 - WYSOCKI (J.), MIEWIAROWSKI (S.), RACHON (K.) - Glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase and aldolase in epidemic hepatitis, *Polski, Tygod, Lekar. i. Wiachomosi, Lekar* 1960, 15, 1.445 (Chem. Abst., 55, 11, 618 g).
- 102 - YOUNG (A.G.), - Expérimental studies of acute poisoning by aniline and aniline derivates, *J. Pharmacol. Proc.*, 1926, 25, 148.
- 103 - YOUNG (A.G.), MUEHLBERGER (C.W.), MEEK (W.J.) - Toxicological studies of acute aniline poisoning : I Expérimental studies of acute aniline poisoning, *J. Pharmacol.* 1926, 27, 101.
- 104 - ZIBISKER (D. E.), ALIKINA (Z. G.) - Determination of blood aldolase activity and the early diagnosis of infectious hepatitis, *Zdravookhranie Belorussii*, 1959, 5, 13. (Chem. Abst., 55, 10.666 e).

TABLE des MATIERES

	Pages
- INTRODUCTION	3
<u>I - PREMIERE PARTIE : GENERALITES</u>	5
I - I - Les agents méthémoglobinisants	6
I - 2 - Action méthémoglobinisante et atteinte hépatique	12
<u>II - DEUXIEME PARTIE : RECHERCHES PERSONNELLES</u>	15
II - 1 - Protocole expérimental	16
II - 2 - Techniques analytiques	20
II - 3 - Résultats	34
II - 4 - Discussion et interprétation des résultats	58
- CONCLUSIONS	63
- BIBLIOGRAPHIE	64

